
ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ, ОБЗОРЫ

УДК 636.03:612.3:577.152.313

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.3.5-19

**НОВЫЕ АСПЕКТЫ В ТРАКТОВКЕ РОЛИ ФИТАЗЫ В ПРОЦЕССАХ
ПИЩЕВАРЕНИЯ У ПРОДУКТИВНЫХ ЖИВОТНЫХ**¹Крюков В.С., ²Зиновьев С.В.¹ООО «Кормогран», Москва; ²ВНИИ птицеперерабатывающей промышленности – филиал ФНЦ ВНИТИ птицеводства, пос. Ржавки Московской обл., Российская Федерация

Фитаза получила широкое распространение в кормлении животных; из всех публикаций, описывающих использование ферментов в кормлении животных, более половины посвящено фитазе. При этом у исследователей возникают вопросы, которые не получили ответов. Основные разделы обзора: ведущая роль эндогенных ферментов, расщепляющих фитаты, экстрафосфорное действие фитазы, антипитательное действие фитатов, метаболизм фитиновой кислоты, факторы, влияющие на инициацию дефосфорилирования фитиновой кислоты, о применении «супердоз» фитазы. Распространено мнение об антипитательном действии фитатов, в связи с действием фитиновой кислоты, высвобождающейся из фитатов. Фитиновая кислота вступает в реакции с питательными веществами, тормозя их усвоение. Под действием фитаз фитиновая кислота расщепляется на отдельные фосфатные эфиры инозитола. С увеличением глубины распада антипитательное действие фитиновой кислоты снижается. Ошибочно принижается роль эндогенных фитаз по сравнению с экзогенными. Понятие об «экстрафосфорном» действии фитазы не может быть обосновано, так как её единственное свойство - гидролиз фосфорных эфиров инозитола. Доказано, что торможение катаболизма фитиновой кислоты происходит на уровне дефосфорилирования инозитол-(1,2,5,6)-тетрафосфата.

Ключевые слова: фитаза, катаболизм фитиновой кислоты, антипитательное действие фитатов, экстрафосфорное действие фитазы.

Проблемы биологии продуктивных животных. 2021. 3: 5-19.

Введение

В последние 20 лет фитаза стала самой изучаемой среди кормовых ферментов. Из множества публикаций на долю фитазы приходится более половины. Это обусловлено тем, что её применение в практическом животноводстве чаще других ферментов сопровождалось положительным действием, в результате она оказалась наиболее востребованным ферментом. Генно-инженерные технологии позволили создать высокопродуктивные штаммы бактерий и микромицетов, продуцирующих фитазы с заданными свойствами. Значительное количество исследований направлено на изучение действия фитазы и выявление условий, повышающих её эффективность. Интенсивное изучение механизма действия фитазы позволило выявить множество фактов, которые не всегда согласовывались между собой и не находили объяснения. Это не является неожиданным, поскольку изучали фитазы разного происхождения с неодинаковой активностью и на фоне различных кормов. В 2019 г. в настоящем журнале был опубликован обзор о действии фитаз в пищеварительном тракте, который отразил текущее состояние и некоторые проблемы в изучении фитаз (Крюков и др. 2019). Проведенный дополнительный анализ многочисленных публикаций позволил выявить критические позиции в сложившейся трактовке механизма действия фитатов и фитазы. Это явилось поводом для написания настоящей статьи и переоценке ряда устоявшихся взглядов.

Ведущая роль эндогенных ферментов, расщепляющих фитаты

Поводом для создания кормовых фитаз явилась ограниченная доступность фосфора из растительных кормов. Исследователи часто указывали, что собственные фитазы ЖКТ обладают слабой активностью, при расщеплении фитатов корма (Maenz, Classen, 1998; Maenz et al., 1999, Труфанов, 2011; Gontia-Mishra, Tiwar, 2013; Abd El-Hack et al., 2018), однако это некорректное мнение, часто повторяющееся в научных статьях, не учитывающих экспериментальные данные других исследователей. Доля фитатов, перевариваемых эндогенными фитазами, обычно выше, чем обеспечивают добавленные в корм экзогенные фитазы (She et al., 2017; Ingelmann et al., 2019). Так, в эксперименте на бройлерах доступность фосфора пшеницы составила 30,7%; кормовая фитаза повышала её на 16,1%, кукурузы – на 28,2% (Leske, Coon, 1999). Аналогичные данные были получены в разное время другими исследователями (Tamim et al., 2004; Zeller et al., 2015; Bello et al., 2019; Ingelmann et al., 2019). Экзогенные фитазы обеспечивают прирост доступного фосфора не настолько много, по сравнению с эндогенными, чтобы считать их роль незначительной. Имеются указания, что при скармливании бройлерам комбикорма с преобладанием пшеницы, не подвергнутого термообработке, активность природных фитаз в ЖКТ была достаточно высокой, и добавление в рацион экзогенной фитазы не влияло на рост птицы (Zeller et al., 2015). Поэтому, изучая механизм действия экзогенных фитаз, необходимо учитывать активность фитаз кормов, продуцируемых микрофлорой и выделяемых слизистой оболочкой кишечника (Nys et al., 1996), а также эндогенных фосфатаз, роль которых изучена слабо. Определяемые величины доступности фосфора фитатов зависят от методологии исследования, источника и доз фитазы, а также возраста птицы (Ingelmann et al., 2019).

Переваримость фитатов в подвздошной кишке бройлеров под действием природных фитаз составила 50,6%; при включении в рацион 500 ед. фитазы/кг она повысилась всего на 13% и при 1000 ед./кг – на 17,7%. В тоже время переваримость фитатов во всём ЖКТ составила 38,3%, 61,2% и 68,1% соответственно (Dersjant-Li et al., 2019a). Приведенные данные показывают, что, независимо от метода изучения переваримости фитатов, их расщепление под влиянием эндогенных фитаз было преобладающим по сравнению с её приростом под влиянием экзогенных фитаз. Обращает внимание, что под влиянием природных фитаз переваримость фитатов во всём ЖКТ была на 12,3% ниже, чем в подвздошной кишке. Причины снижения доступности фосфора при действии эндогенных фитаз после подвздошной кишки не установлены. В тоже время при включении в корм экзогенных фитаз доли переваренного фосфора в подвздошной кишке и в ЖКТ практически совпадали. Из этого следует, что действие экзогенных фитаз во всём кишечнике будет показывать более высокие значения их эффективности. Вероятно, экзогенные фитазы повышают переваримость фитатов в нижних отделах кишечника. Однако этот факт пока не нашёл научного подтверждения (Dersjant-Li et al., 2019a).

Изучение переваривания фитатов в различных отделах пищеварительного тракта у цыплят показало, что их расщепление начинается в зобе, где его интенсивность многократно возрастает под влиянием экзогенных фитаз (табл. 1)

Таблица 1. Расщепление фитатов в ЖКТ у бройлеров, %

Отделы ЖКТ	Подопытные группы ^a			
	ОР	Phy A	Phy E1	Phy E2
Зоб	9	64	31	44
12-перстная + тощая	59	63	65	88
Подвздошная кишка	74	74	79	82
Слепая кишка	91	93	98	96

^aГруппы: 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*. Доза всех фитаз: 500 ед./кг

Показано неодинаковое проявление локальной активности каждого испытанного фермента. Наибольшее расщепление фитатов в зобе происходило под влиянием фитазы Phy A, тогда как в тонком кишечнике максимальную активность проявила Phy E2. В то же время активность фитаз Phy A и Phy E1 оказалась ниже. Расщепление фитатов под влиянием эндогенных фитаз (OP) на протяжении кишечника возрастало примерно с той же динамикой, что и под действием экзогенных. Количество переваренных фитатов в подвздошной кишке во всех группах было схожим и почти сравнялось в слепых отростках, т.е. окончательное расщепление фитатов в ЖКТ мало зависело от включения в корм экзогенных фитаз (Zeller et al., 2015).

Интересно, что расщепление фитатов в ЖКТ было почти полным, независимо от активности фитаз корма, но при этом удержание фосфора в организме в опытных группах различалось (Schlemmer et al., 2001). Если учесть, что использование фосфора фитатов редко превышает 60%, то снижение усвоения фосфора, при его высокой переваримости, не находит научного объяснения. На основании результатов ряда экспериментов, в том числе приведенных в ранее опубликованном обзоре (Крюков и др. 2019), можно сделать вывод, что эндогенные фитазы играют ведущую роль в переваривании фитатов; использование экзогенных фитаз позволяет повысить использование фосфора. Анализ результатов табл. 1 показывает, что расщепление фитатов эндогенными фитазами в зобе минимально; в то же время под влиянием добавленных в корм кислых гистициновых фитаз оно повышалось в 4-7 раз. Учитывая низкую кислотность среды, трудно ожидать растворения фитатов в зобе и найти объяснение действия на них испытанных фитаз. Значительная часть фитатов в кормах присутствует в виде кальциевых или магниевых солей, но их расщепление в ЖКТ при высоком pH целенаправленно не изучено. Эндогенные фитазы, активно расщепляющие фитаты в ЖКТ, не идентифицированы, соответственно не известен механизм их действия.

В научной литературе широко распространено понятие «переваримость фитатов». К фитатам относятся соединения, включающие анион фитиновой кислоты (IF_6^- или мио-инозитол-1,2,3,5-цис-4,6-гексаксидигидрогенфосфат), однако они не перевариваются фитазой. Последняя является фосфогидролазой мио-инозитол-1,2,3,5-цис-4,6-гексаксидигидрогенфосфата, которая катализирует отщепление фосфата от аниона фитиновой кислоты и не действует на фитаты. Поэтому понятие «переваримость фитатов» с точки зрения современных знаний является неудачным, но закрепилось исторически с тех пор, когда знания о механизме расщепления фитатов были ограничены.

Экстрафосфорное действие фитазы

Первые попытки применения фитазы в качестве кормовой добавки для повышения доступности фосфора из растительных кормов были предприняты в Северной Америке в 1962 г. (Nelson, 1967; Wodzinski, Ullah, 1996;). В то время они не получили распространения в связи с их дороговизной и дешёвыми неорганическими источниками фосфора. Позднее, в силу роста цен на минеральные источники фосфора и законодательных изменений в ряде государств, касающихся ограничения содержания фосфора в кале (помёте), на фитазы обратили внимание. Известно, что с увеличением содержания фитатов в потребляемых кормах снижается продуктивность в результате снижения использования питательных веществ корма, угнетения секреции ферментов, переваривающих пищу, и всасывания продуктов гидролиза (Cowieson et al., 2004; 2006; Ravindran et al., 2006; Cowieson, Ravindran, 2007), а также ухудшения иммунных функций организма (Liu et al., 2008).

Росту популярности фитаз способствовало обнаруженное увеличение доступности аминокислот, обменной энергии и ряда микроэлементов, сопутствующее повышению использования фосфора. Этот эффект назвали «экстрафосфорным» (Selle et al., 2000; Adeola and Cowieson, 2011; Siegert et al., 2019; Moss et al., 2019; Walk, Olukosi, 2019). Этому также способствовало ошибочное отождествление процесса переваривания с процессом всасывания и использования аминокислот (Крюков, Зиновьев, 2015). Однако фитазы в силу их свойств не могут участвовать в переваривании других питательных веществ; они узко специфично подвергают гидролизу эфирные связи фитиновой кислоты, отщепляя от неё анион ортофосфата. Поэтому

понятие «экстрафосфорное действие фитазы», неудачное, так при действии фитазы снижается концентрация свободной фитиновой кислоты и её низших фосфатных эфиров - анионов ИФ_{5,4} (Dersjant-Li et al., 20196), оказывающих негативное влияние на пищеварение и всасывание питательных веществ.

Из этого следует, что повышение переваримости и доступности протеина, углеводов и минералов прямо не связано с действием фитаз. Попутно по аналогии можно отметить, что применение карбогидраз тоже сопровождается повышением эффективности использования протеина, но к ним понятие «экстракарбогидразный эффект» не используется. Понятие «экстрафосфорное действие», используемое в коммерческой среде для рекламных целей, является антиподом понятию «антипитательное действие»: первое проявляется в результате преодоления второго. Уточнение понятий при описании механизма действия фитаз позволяет конкретизировать понимание проблемы при определении дальнейших направлений исследований.

Указывают, что успешность применения фитаз для повышения использования аминокислот корма остаётся спорной (Selle, Ravindran, 2007). По нашему мнению, она является не столько спорной, сколько обусловлена неизученностью причин, вызывающих различия между результатами экспериментов. Частично негативное действие фитатов связывают с повышенным выделением и потерями эндогенных белков (Cowieson et al., 2009). Однако этот фактор, вероятно, не является определяющим, так как в экспериментах установлено, что в присутствии фитазы повышалась как кажущаяся (Yi et al., 1996) так и истинная перевариваемость белка, то есть с учётом эндогенных потерь (Ravindran et al., 1999). Наблюдаемая изменчивость эффекта улучшения доступности аминокислот в присутствии фитаз обусловлена рядом факторов, которые не могут быть одинаковыми и повторяться от опыта к опыту. Эти факторы включают в себя: 1 - свойства компонентов рациона и их соотношение; 2 - различия в свойствах применяемых фитаз и их доз; 3 - концентрацию неорганических источников фосфора и кальция в корме; 4 - концентрацию и свойства фитатов корма; 5 - степень переваримости структурных полисахаридов корма; 6 - переваримость протеина; 6 - аминокислотный состав протеина корма; 7 - технологии приготовления комбикормов; 8 - тип кормления (сухой или жидкий); 9 - возраст и порода животных; 10 - различия в методологии проведения исследований. Создать одинаковые условия при проведении экспериментов с учётом перечисленных факторов и их вероятных сочетаний вряд ли возможно.

Обобщение результатов изучения эффективности фитаз позволило прийти к заключению, что: «... научные знания о фитазах до сих пор не нашли решения, отвечающего требованиям питания и окружающей среды, которые необходимы в реальных условиях. Следует продолжить дальнейшие исследования по выявлению новых фитаз, разработке лучших фитаз и разработке более экономичных систем их использования ...» (Yao et al., 2011). Согласимся с первой частью этого утверждения, однако неясно, чем можно руководствоваться при разработке новых лучших фитаз, если не изучены многие стороны механизма их действия на уровне «фитат-фитаза» и фитат-ионов с другими питательными веществами в химусе ЖКТ. Создание более продуктивных штаммов или более активных фитаз, является важным, но не главным путём решения проблемы, поскольку в практическом плане её можно решить увеличением доз существующих кормовых фитаз. Проблема в том, что, не располагая «научными знаниями о механизмах действия фитаз» (Yao et al., 2011), нельзя сформулировать критерии требований к «новым, лучшим» фитазам. К подобному заключению пришла другая группа исследователей, указав, что ни одна из известных фитаз не может удовлетворить всем требованиям к «идеальной» кормовой добавке (Bedford, Walk, 2016)

Антипитательное действие фитатов

Распространено мнение, что фитаты обладают антипитательным действием, однако это скорее профессиональный жаргон, чем научное понятие. Антипитательное действие проявляет свободная фитиновая кислота - ИФ₆ и её отрицательно заряженные метаболиты ИФ_{5,4}, однако их концентрация в природных кормах незначительна. Они образуются в результате попадания фитатов в кислую среду желудка, где растворяются и переходят в ионизированное состояние. Затем в двенадцатиперстной кишке, в которой среда приближается к нейтральной, происходит повторное

образование новых фитатов в результате связывания ионов ИФ₆₋₄ с макро-, микроэлементами, белками и аминокислотами, снижающими их доступность для действия фитазы; это и определяет сущность антипитательного действия (Greiner, Konietzny, 2006). Взаимодействие ионизированной ФК с питательными веществами *in vitro* описано в научной литературе, однако динамика образования вторичных фитатов и действие на них фитаз *in vivo* не изучены (Балабан и др., 2018). В значительной мере это сопряжено с техническими и методическими трудностями; в результате ряд вопросов по механизму действия фитаз и фитиновой кислоты остаётся без ответа.

Из вышеизложенного становится понятно, что наиболее доступным способом преодоления антипитательного действия фитатов является снижение концентрации фитиновой кислоты, входящей в состав фитатов, которое уменьшает концентрацию свободной ФК и её метаболитов и последующее образование их комплексов с белками (Nys et al., 1996). Нерастворимые фитаты не образуют свободной фитиновой кислоты, способной к ионизации, и не проявляют антипитательного действия.

В популярной литературе антипитательное действие фитатов иногда связывают с низкой доступностью фосфора, однако последнее свидетельствует только о низком использовании этого элемента и не связано с антипитательными свойствами. Отождествление этого факта с антипитательным действием фитатов является ошибочным (Джоунс. 2014). Фитаты, попадая в зоб, не оказывают антипитательного действия, так как в содержимом зоба они слабо растворимы, кроме того в зобе процессы переваривания других питательных веществ не выражены, поэтому отсутствует достаточное количество веществ, которые могли бы вступать в реакцию с ИФ₆ или её метаболитами. Корм начинает перевариваться в желудке и одновременно в кислой среде растворяются фитаты и ионизируется ИФ₆, поэтому в нём и в двенадцатиперстной кишке могут наиболее выражено протекать процессы, обуславливающие антипитательное действие ионов ИФ₆₋₄. У птиц этому способствует рефлюкс химуса двенадцатиперстной кишки, который сопровождается повторным воздействием кислой среды на перевариваемые вещества, в том числе и на фитаты. Без учёта влияния рефлюкса, предположения об изменении состава фитатов в ЖКТ на основании результатов исследований, проведенных *in vitro*, имеют ограниченное значение. Упущение из внимания указанных физиологических особенностей птицы создаёт трудности для объяснения результатов экспериментов и может приводить к ошибочным выводам.

Катионы из фитатов корма в кислой среде желудка замещаются на Н⁺, и фитаты растворяются, превращаясь в анионы ИФ₆; часть фосфатных групп, обладает отрицательным зарядом и в двенадцатиперстной кишке (Costello et al., 1976; Liu et al., 2017). Взаимодействие между анионами ИФ₆ и аминокислотами белка, имеющими положительный заряд, приводит к образованию трудно растворимых соединений, недоступных для повторного переваривания, то есть проявляется антипитательное действие. Интенсивность этого процесса зависит от природы белка, концентрации фитатов в корме и рН среды ЖКТ. Угнетающее действие фитата натрия на переваривание протеина было чётко показано в эксперименте на цыплятах, получавших полусинтетический рацион. В зависимости от дозы добавляемого фитата натрия, переваривание протеина снижалось с 85 до 21 и 2% (при удвоении дозы). Важно обратить внимание, что в опыте основной рацион не содержал природных фитатов (Cowieson et al., 2006). Максимальное угнетающее действие достигается при отношении фитатов к белку около 1:2, то есть 10 г фитатов в расчёте на 200 г протеина (Mothes et al., 1990), что соответствует параметрам стартера, используемого в промышленном птицеводстве (Selle et al., 2000)

Растворимость и переваривание протеина желудочными протеазами изменяют его молекулярно-структурное состояние и заряд, создавая условия для его связывания с ИФ₆₋₄ (Anderson, 1985). Это подтверждено при изучении белковых фракций зерна бобовых культур, содержащих 17,7-19,9% положительно заряженных аминокислот, растворимость которых существенно повышалась при расщеплении ИФ₆ (Morales et al., 2013).

Ингибирование фитатами протеолитических ферментов, вырабатываемых животными, связывают с образованием в ЖКТ прочных бинарных комплексов, включающих ИФ₆ и фермент (белок). Значительная их часть, попадая в кишечник, в котором рН выше изоэлектрической точки

белков корма, подвергается распаду, однако высвобожденный пепсин не активен в среде кишечника. Белки в этих условиях приобретают отрицательный заряд (Kies et al., 2006; Selle et al., 2006). Анионы ИФ₆₋₄ при pH выше 5,0 не могут вступать в реакцию с отрицательно заряженными белками и аминокислотами. В этом случае анион фитатов вступает в реакцию с двухвалентным металлом – чаще всего кальцием или цинком. Затем образуется тройной комплекс: ИФ₆-металл-белок. Кроме того, молекулы белка могут плотно упаковываться вокруг относительно небольшого аниона ФК, что приводит к образованию макромолекулярных скоплений или нерастворимых коацерватов (Cosgrove, 1966). В результате появляются новые фитаты, которые отсутствовали в потреблённых кормах (Anderson et al., 1985; Champagne et al., 1990; Oh et al., 2004; Nissar et al., 2017). Новообразованные протеиновые фитаты имеют разную растворимость и ограниченную доступность для протеаз, что сопровождается проявлением антипитательного действия. В результате антипитательное действие будет зависеть от состава кормовых ингредиентов.

Выводы о роли белок-ИФ₄₋₆ комплексах в ЖКТ основаны в значительной мере на предположениях. Многочисленные эксперименты, посвящённые изучению превращений на уровне «фитат – фитаза» в ЖКТ до настоящего времени не позволили вскрыть механизм их взаимодействия. Это обусловлено сложностью моделирования управляемого процесса пищеварения (Selle et al., 2012). В опытах *in vitro* установили, что в присутствии ИФ₆ и эфиров инозитола с ИФ₅ по ИФ₃ растворимость соевого белка активно возрастала со снижением числа фосфатных групп, то есть падала интенсивность его связывания с инозитолфосфатами. Одновременно наблюдали повышение гидролиза белка пепсином (Yu et al., 2012). Подтверждена способность ИФ ингибировать расщепление пепсином казеина и бычьего сывороточного белка, которая наиболее выражена в присутствии ИФ₅ и ИФ₆, тогда как ИФ₁ и ИФ₂ не оказывали влияния (Крюков и др., 2019). В условиях *in vivo* наблюдали, что повышение расщепления фитатов корма не всегда сопровождается пропорциональным ростом доступности отдельных аминокислот (Siegert et al., 2019).

Цитированные исследования позволяют прийти к выводу, что антипитательное действие обусловлено не фитатами, а растворимыми ИФ₆₋₄ (ионами), которые образуют в ЖКТ комплексы с металлами, белками и уже переваренными аминокислотами. Связывание пищеварительных ферментов с ИФ₆₋₄ снижает переваривание и соответственно - доступность питательных веществ. Кроме того, антипитательное действие проявляется в том, что образующиеся в ЖКТ анионы ФК₆₋₄ связывают кальций, цинк, железо, медь, вызывая их дефицит, снижающий активность ряда ферментов, для которых минералы являются кофакторами. Действие фитаз определяет скорость расщепления фитиновой кислоты и образование низших фосфорных эфиров инозитола. Механизм действия фитаз изучен недостаточно, большая часть исследований проведена при изучении статических систем *in vitro*, которые сложно или невозможно переносить на животных. В большинстве работ основное внимание уделяют специфической функции фитаз, отражающей количество фосфора, высвобождаемого из фитатов. Это внимание закрепилось исторически в связи целевым созданием фитаз. В дальнейшем, изучая метаболизм ФК, установили, что антипитательное действие фитатов обусловлено высвобождением из них катиона ФК и метаболитов первых стадий дефосфорилирования - ФК₅₋₄. В связи с этим для преодоления антипитательного действия фитатов следует учитывать скорость процессов дефосфорилирования (Żyła et al., 2004).

Метаболизм фитиновой кислоты

На основании данных, полученных рядом исследователей при изучении путей превращения фитиновой кислоты, была определена последовательность реакций катаболизма инозитолгексакис-дигидрофосфорной кислоты (рис. 1).

Финальными метаболитами ИФ₆ в большинстве случаев являются ортофосфат, инозитолмонофосфат и реже инозитол (Bohn et al., 2007). Фитазы подразделяют по кинетике их действия не только на ИФ₆, но и на низшие фосфатные эфиры инозитола: ИФ5-2 (Bedford et al., 2016; Oh et al., 2004;). Распространённые гистидиновые кислые фитазы функционально различаются по

номеру углеродного атома в кольце *мио*-инозитола, с которого отщепляется первая фосфатная группа. Постепенное отщепление фосфатных групп сопровождается образованием низших фосфатных эфиров инозитола с повышенной растворимостью; у *мио*-инозитолгексакисфосфата в тонком кишечнике она составляет 2%, с уменьшением количества фосфатных групп с 5 до 2 она возрастает до 7; 8; 31 и 75% соответственно (Schlemmer et al., 2001), в результате повышается доступность низших метаболитов для действия фитазы.

Первые три стадии дефосфорилирования ФК - ИФ₅ → ИФ₄ → ИФ₃ играют ведущую роль в создании условий для полного её гидролиза. Сокращение числа фосфатных групп у метаболитов ФК уменьшает их отрицательный заряд и способность к связыванию других питательных веществ. Недавно на цыплятах установили, что при включении в рацион 500 ед. гистидин кислой фитазы./кг в тощей кишке повышалась активность эндогенной щелочной фитазы, которая расщепляет труднорастворимые фитаты двухвалентных металлов (Akter, Graham, 2017).

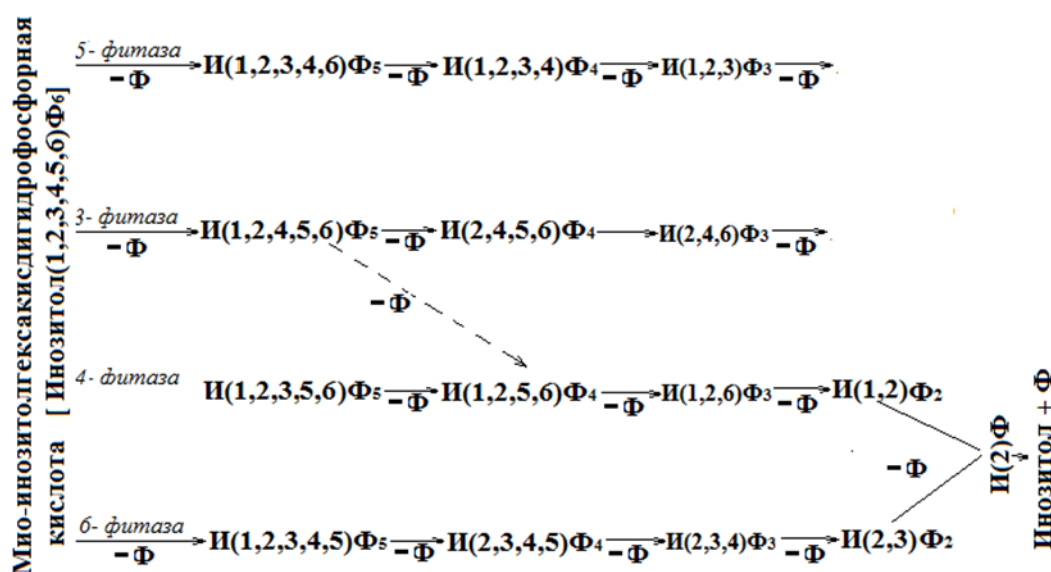


Рис. 1. Основные пути катаболизма фитиновой кислоты (Greiner, Konietzny, 1998; Greiner et al., 2007; Rao et al., 2009)

В научной литературе установилось мнение, что активность фитаз при расщеплении фитатов ограничена первой реакцией дефосфорилирования независимо от типа фитазы (Blaabjerg et al., 2011). Анализ данных по концентрации метаболитов ИФ₆ в химусе ЖКТ и помёте цыплят исключает основание для такого вывода. При изучении действия экзогенной фитазы установили, что у цыплят, получавших корм без добавки фермента, концентрация ИФ₆ в зобе снизилась по сравнению с его содержанием в потребляемом корме на 30% (Sommerfeld et al., 2018). Включение в корм фитазы в количестве 500, 1500, и 3000 ед./кг повышало переваримость ИФ₆ соответственно на 17, 27 и 28%.

Пищеварение в кишечнике намного активнее, чем в зобе, поэтому действие фитаз прослеживалось более выражено (табл. 2). Так, концентрация ИФ₆ в подвздошной кишке цыплят, не получавших фитазу, повысилась в 2,6 раза по сравнению с её содержанием в корме и зобе. Это можно объяснить активным перевариванием и всасыванием основных питательных веществ и более медленным расщеплением фитатов, которое сопровождалось ростом доли сохранившихся ИФ₆ по сравнению с другими перевариваемыми веществами. Под действием экзогенной фитазы содержание ИФ₆ в подвздошной кишке снижалось больше, чем в зобе, составляя соответственно 45, 11 и 9%. Включение в корм фитазы в количестве 500 ед./кг было недостаточным для полного расщепления ИФ₆ и его метаболитов. Снижение концентрации метаболитов, сохранившихся

фосфатную группу у 6-го углеродного атома инозитола, даёт основание предполагать, что в метаболизме ИФ₆ участвовали природные 3-, 4-, 5-фитазы (рис. 1), которые в корм не добавляли. Концентрация И(1,2,5,6)Ф₄ под влиянием фитазы в дозе 500 ед./кг увеличилась в 2,4 раза, исходным продуктом при этом является И(1,2,4,5,6)Ф₅. С увеличением в корме содержания фитазы до 1500 и 3000 ед./кг концентрация всех метаболитов ИФ₅ снизилась в несколько раз. Это не могло быть связано с меньшим их образованием, так как гидролиз ИФ₆ в этом случае максимально возростал, достигнув 93-94%.

Таблица 2. Влияние фитазы на концентрацию метаболитов и изомеров фитиновой кислоты в подвздошной кишке

Варианты	Метаболиты ИФ ₆							
	ИФ ₂	И(1,5,6)Ф ₃	И(1,2,3,4)Ф ₄	И(1,2,5,6)Ф ₄	И(1,2,3,4,6)Ф ₅	И(1,2,3,4,5)Ф ₅	И(1,2,4,5,6)Ф ₅	ИФР ₆
	мкмоль/г сухого вещества корма							
	н.у.о. ¹	н.у.о.	н.у.о.	н.у.о -	0,3 ^a	0,4 ^a	0,6	11,6
	мкмоль/г сухого вещества химуса							
Контроль (К)	1,1 ^b	н. д. ²	1,0 ^{a,b}	2,2 ^d	0,7 ^a	3,3 ^b	1,4 ^a	30,0 ^a
К+Phy500*	2,3 ^a	н.о.у	0,9 ^b	5,2 ^a	0,2 ^b	3,7 ^{a,b}	1,1 ^b	13,4 ^b
К+Phy1500	2,7 ^a	н. д.	0,2 ^c	4,2 ^{a,b}	н. д.	0,8 ^c	0,3 ^c	3,3 ^c
К+Phy3000	2,5 ^a	н. д.	н. д.	3,8 ^{b,c}	н. д.	0,6 ^c	0,2 ^c	2,8 ^c

* 6-фитаза Quantum Blue; ¹н.о.у. - ниже уровня обнаружения; ²н.д. - не обнаружено; ^{a-c} средние величины с разными буквами верхнего индекса существенно различаются (P<0.05).

Направивается вывод о том, что при этом происходило ускоренное превращение всех метаболитов ИФ₅ в ИФ₄ (Sommerfeld et al., 2018; Walk et al., 2018). Возможно, это связано с тем, что гистидиновые кислые фитазы после отщепления первой фосфатной группы от ИФ₆ не теряют связи с субстратом и подвергают гидролизу последующие связи фосфатных групп с инозитолом (Menezes-Blackburn et al., 2015). По результатам опыта, И(1,2,4,5,6)Ф₅ превращался только в один метаболит - И(1,2,5,6)Ф₄, тогда как предшественниками И(1,2,3,4)Ф₄ могли быть И(1,2,3,4,5)Ф₅ и И(1,2,3,4,6)Ф₅, суммарная концентрация которых была выше, по сравнению с И(1,2,4,5,6)Ф₅. Несмотря на это, концентрация И(1,2,3,4)Ф₄ во всех группах была ниже по сравнению с И(1,2,5,6)Ф₄. Это могло быть вызвано активным его образованием в результате дефосфорилирования у 4-го углеродного атома инозитола или медленной скоростью дефосфорилирования И(1,2,5,6)Ф₄, несмотря на то, что фитаза Quantum Blue инициирует расщепление фитиновой кислоты у 6-го углеродного атома инозитола. Любая из названных возможностей даёт основание считать, что накопление в среде И(1,2,5,6)Ф₄ свидетельствует о том, что этот метаболит является узким местом в цепи реакций последовательного дефосфорилирования ИФ₆→ИФ₁. Снижение концентрации И(1,2,3,4,6)Ф₅, сохраняющим фосфатную группу в 6 положении в присутствии 6-фитазы, свидетельствует о возможном существовании каких-то факторов, вызывающих активацию щелочных фосфатаз и/или факторов, тормозящих действие 6-фитаз.

Высказанное предположение о торможении катаболизма ИФ₆ в цепи последовательных реакций дефосфорилирования на уровне И(1,2,4,6)Ф₄ подтверждается результатами, полученными при определении содержания суммы изомеров отдельных метаболитов в помёте цыплят аналогичного возраста под влиянием таких же доз фитазы Quantum Blue (Beeson et al., 2017). Содержание ИФ₆ в помёте под действием фитазы в дозе 500 ед./кг снизилось на 48% и под влиянием 1500 ед./кг - на 78%. Потребление корма с активностью фитазы 500 ед./кг не повлияло на концентрацию суммы метаболитов ИФ₅, но отчётливо повысило сумму метаболитов ИФ₄. В группе, цыплят, получавших корм с дозой фитазы 1500 ед./кг, концентрация ИФ₆ снизилось в 4,5 раза по

сравнению с её содержанием в контрольной группе. Это, несомненно, обусловлено его интенсивным превращением в ИФ₅, тем не менее, уровень последнего тоже снизился, что свидетельствует об активации процесса превращения ИФ₅ в ИФ₄. Торможение дефосфорилирования ИФ₄, привело к увеличению его концентрации в 2,4 раза по сравнению с контрольной группой.

Результаты, приведенные в табл. 2, а также исследования (Beeson et al., 2017) позволяют предположить, что медленное переваривание ИФ₆ при включении в корм 500 ед./кг фитазы могло быть обусловлено двумя причинами: 1) недостатком фермента по отношению к субстрату. 2) ограничением доступности фермента к ИФ, содержащихся в кормах. С точки зрения регуляции последовательных этапов дефосфорилирования ИФ₆→инозитол, обе причины не связаны с дефосфорилированием внутри цепи последовательных превращений. Узким местом, тормозящим процесс, является низкая скорость дефосфорилирования ИФ₄, проявляющаяся даже при высоких дозах экзогенной фитазы. Исследования *in vitro* с использованием свободного субстрата: фитата натрия, доступность которого не была ограничена структурой клеток корма или его возможными связями с другими веществами, позволили подтвердить вывод о том, что дефосфорилирование ИФ₄ является лимитирующим во всей цепи последовательных реакций отщепления фосфата от исходного ИФ₆ (Qvirist et al., 2015). Другие исследования (Sandberg et al., 1999) позволяют предположить, что повышенный уровень И(1,2,4,6)Ф₄ может быть связан не только с активностью используемых фитаз, но и с его стереохимическими свойствами, обуславливающими устойчивость.

Факторы, влияющие на инициацию дефосфорилирования фитиновой кислоты

Ряд работ, в которых считается, что величину и скорость дефосфорилирования ИФ₆ в ЖКТ тормозит отщепление первой фосфатной группы, не создаёт противоречия вышеприведенному заключению о торможении катаболизма ИФ₆ на уровне дефосфорилирования И(1,2,5,6)Ф₄, если процесс оценить с учётом имеющихся данных (Beeson et al., 2017; Sommerfeld et al., 2018). Вывод о торможении первого этапа дефосфорилирования справедлив, но он обусловлен не кинетикой реакций гидролиза ИФ₆. Результаты исследований зависят от методологии проведения исследований (Peguman et al., 2017; Abd El-Nack et al., 2018). В большинстве случаев торможение обусловлено количественной недостаточностью фермента по отношению к субстрату или же ограниченным высвобождением фитиновой кислоты из фитатов и её низкой доступностью для действия фитазы (Beeson et al., 2017; Sommerfeld et al., 2018). Установлено влияние не только структуры зерна на проявление активности фитазы, но и состава других веществ, в которые ФК входит. Так, в пшенице фитаты входят в глобиды, содержавшие 40% ФК, 46% белка, а также калий, магний, кальций. Кинетика реакций дефосфорилирования ФК в составе глобидов показала, что величины K_m и V_{max} были на 29 и 37% ниже по сравнению со значениями, установленными при использовании в качестве субстрата свободной ФК. Расщепление ИФ₆ под влиянием природной фитазы, выделенной из пшеницы, у обоих субстратов инициировалось как у 3-, так и у 6-углеродных атомов инозитола (Greiner et al., 1998).

В многочисленных публикациях показано, что добавка в корм экзогенных фитаз повышает расщепление фитатов (Maenz et al., 1999; Труфанов, 2011; Gontia-Mishra, Tiwar, 2013), однако механизм этого действия не получил объяснения, и во всех ли случаях это связывают с недостаточной активностью эндогенных фитаз. Однако это слишком прямолинейное объяснение – надо учитывать, что экзогенные фитазы отличаются по свойствам от эндогенных и, возможно, эти отличия позволяют им расщеплять ту часть фитатов, которая остаётся недоступной для эндогенных фитаз.

Стенки клеток зерна состоят из целлюлозы с преобладанием гемицеллюлозы, большая часть которой представлена арабиноксиланами с малым количеством β -глюканов и маннанов (Stone, 2006). В организме домашней птицы не синтезируются ферменты, способные подвергать гидролизу эти полисахариды, поэтому часть внутриклеточного содержимого остаётся физически недоступной для фитаз. Добавление в корм карбогидраз приводит к разрушению целостности клеточных стенок и к образованию каналов, через которые поступает вода и ферменты, переваривающие белок, крахмал и

фитаты. Ожидают, что более эффективными для этой цели могут быть ксиланазы и целлюлазы (Zanella et al., 2004; Leslie et al., 2007; Adeola, Cowieson, 2011). При включении в корм целлюлазы наблюдали повышение доступности фосфора на 30,4% и протеина – на 21,8% (Zyla et al., 1995). Под действием экзогенной протеазы высвобождение фосфора увеличивалось всего на 15%. Рост использования фосфора из фитатов корма при добавлении к нему ферментов, не обладающих фосфогидролазной активностью, подтверждает, что в естественных кормах доступность к фитатам ограничена структурными элементами клеток или связями фитиновой кислоты с другими веществами, ограничивающими действие фитазы.

У свиней корм дольше находится в кислой среде желудка, чем у птицы, поэтому количество растворимых фитатов должно быть выше. Этим объясняется лучшее использование фосфора из пшеницы свиньями по сравнению с птицей (Barrier-Guillot et al., 1996 а,б). В содержимом желудка около 2/3 от общего количества фитатов присутствовало в жидкой фазе и 1/3 оставалась связанной с твёрдой фракцией корма, доступность фосфора из которой для ферментативного гидролиза затруднена (Schlemmer et al., 2001). Неполное расщепления фитатов *in vivo* в среде с естественными кормами обусловлено ограничением доступности ферментов к субстрату, но при этом остаётся торможение дефосфорилирования доступного метаболита ИФ₄. Результаты, подтверждающие отмеченную закономерность, наблюдали и в других условиях экспериментов (Skoglund et al., 1998; Yu et al., 2012; Pontoppidan et al., 2012; Zeller et al., 2015; Li et al., 2017).

Инициация расщепления фитатов должна происходить на протяжении всего ЖКТ, так как фитиновая кислота не полностью высвобождается из фитатов. Фитазы проявляют активность в основном в кислой среде, фитазы с оптимум активности при рН кишечника теряют активность под действием пепсина, поэтому создание фитаз, устойчивых к действию протеаз, является перспективным. В экспериментах *in vitro* и на цыплятах наблюдали эффективное использование добавки, состоящей из двух фитаз с разным уровнем оптимального рН (Elkhalil et al., 2007; Żyła et al., 2004, 2013; Ennis et al., 2020).

О применении «супердоз» фитазы

Препараты фитаз вначале создавали для повышения доступности фосфора из фитатов корма. В связи с высокой их стоимостью была рекомендована минимальная добавка по активности фермента, обеспечивающая повышение роста молодняка свиней и птицы, которая составляла 500-600 ед./кг. О дополнительных эффектах фитазы, не связанных с её гидролитическим действием, вначале не было известно, что исключало понятие «экстрафосфорное действие фитазы» и «супердозы» фитазы. Понятие «супердоза» не является корректным, так как критерием оптимальности содержания в корме любого вещества является достижение максимальной величины целевого признака. Если ранее рекомендованная доза не обеспечивала максимальной продуктивности, то её нельзя называть оптимальной. Понятие «супердоза» в контексте излагаемой проблемы несостоятельно и применимо лишь в коммерческой среде. Нестабильные результаты при использовании рекомендуемых доз любой фитазы, не являются неожиданностью и они характерны для всех кормовых ферментов. Это обусловлено не ограниченным изучением свойств ферментов, а, главным образом, недостаточной характеристикой сырья по природе содержащихся в нём фитатов и факторов, определяющих их доступность для взаимодействия с ферментами. Помимо факторов пищеварения, необходимо также учесть, что фосфор фитатов при прорастании зерна практически полностью используется в результате расщепления фитатов естественными фитазами; при этом одновременно используются углеводы, протеин и минеральные вещества и происходит изменение (разрушение) исходной структуры зерна. Этот факт подтверждает, что фосфор фитатов зерна может полностью использоваться, а выяснение механизмов, обуславливающих этот эффект, возможно, поможет разработать приёмы более полного использования питательных веществ кормов.

Заключение

Нерастворимые в содержимом ЖКТ фитаты не могут связывать питательные вещества, т.е. не обладают антипитательным действием. Для ориентировочной оценки кормовой фитазы

необходимо определить содержание фитатов в кале (помёте), которое будет отражать долю фосфора фитатов, не использованного в процессе пищеварения. Изменение их концентрации под влиянием фитазы будет свидетельствовать о возможной эффективности действия фитазы. Применение фитазы не снижает антипитательного действия фитатов; фитазы разрушают растворимые фитаты, т.е. разлагают действующие вещества - фитиновую кислоту и её активные катаболиты. В связи с этим важное значение имеет изучение процессов поэтапного дефосфорилирования фитиновой кислоты. Переваривание фитатов зависит от двух основных факторов - присутствия в среде достаточного количества фитазы по отношению к субстрату и его доступности для действия ферментов. Первая проблема решается путём включения в корм достаточного количества экзогенных фитаз. Вторая зависит от повышения переваримости корма в целом с целью повышения растворимости фитатов и доступности фитиновой кислоты для действия фермента. В частных случаях она может быть преодолена включением в корм карбогидраз и протеаз, которые нарушают целостность оболочек клеток, препятствующих доступности гидролаз к питательным веществам цитоплазмы, в том числе и фитатов.

Увеличение доступности аминокислот при включении в корм фитаз показывает, что состав дополнительно переваренных аминокислот не совпадает с составом переваримого протеина при действии эндогенных протеаз. Реальный механизм повышения доступности аминокислот остаётся невыясненным. Можно предположить, что повышение доступности аминокислот обусловлено распадом фитиновой кислоты и снижением связывания аминокислот, образующихся при переваривании, с её активными метаболитами. Избирательное связывание отдельных аминокислот может быть связано с динамикой переваривания протеина и физико-химическими свойствами отдельных аминокислот, что может быть легко проверено с использованием модельных растворов аминокислот в присутствии фитата натрия (и низших фосфорных эфиров ИФ), однако таких исследований до настоящего времени не проведено. Выводы о целесообразности применения фитаз, расщепляющих фитаты в желудке (а у птицы - и в зобе), до появления достаточного количества переваренных веществ, способных связываться с ФК и её метаболитами, косвенно подтверждают предположение о связывании питательных веществ после переваривания. Фитаза обладает единственным действием - она осуществляет гидролиз фитиновой кислоты и её низших фосфорных эфиров, интенсивность которого зависит от многих факторов.

Список литературы

1. Балабан Н.П., Сулейманова А.Д., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р. Гистидиновые кислые фитазы микроорганизмов. // Микробиология. 2018. № 87. С. 635-648.
2. Джоунс Г. Как выбрать наилучшую фитазу при составлении рациона. // Ценовик. 2014. № 10. С. 102-103.
3. Крюков В.С., Глебова И.В., Антипов А.А. Оценка действия фитаз в пищеварительном тракте и использование препаратов фитазы в питании животных (обзор). // Проблемы биологии продуктивных животных. 2019. № 2. С. 19-43.
4. Труфанов О.В. Фитаза в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы. Киев: ПолиграфИнко, 2011. 112 с.
5. 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.
6. Adeola O., Cowieson A.J. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J. Anim. Sci.* 2011. 89. 3189-3218.
7. Akter M., Iji P.A., Graham H. Increasing zinc levels in phytase-supplemented diets improves the performance and nutrient utilization of broiler chickens. *South Afric. J. Anim. Sci.* 2017. 47: 648-660.
8. 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 D.T. Hopkins, eds). St Paul, MN American Association of Cereal Chemists, Inc. 1985. P. 31-45.
9. Barrier-Guillot B., Casado P., Maupetit P., Jondreville C., Gatel F., Larbier M. Wheat phosphorus availability. 1. In vitro study: factors affecting endogenous phytic activity and phytic phosphorus content. *J. Sci. Food & Agric.* 1996a. 70: 62-68.

10. Barrier-Guillot B., Casado P., Maupetit P., Jondreville C., Gatel F., Larbier M. Wheat phosphorus availability. 2. In vivo study in broilers and pigs; relationship with endogenous phytase activity and phytic phosphorus content in wheat. *J. Sci. Food & Agric.* 1996 b. 70: 69-74.
11. Bedford M.R., Walk C.L. Chapter 3. Reduction of phytate to tetrakisphosphate (IP₄) to trisphosphate (IP₃), or perhaps even lower, does not remove its antinutritive properties, In: *Phytate destruction – consequences for precision animal nutrition.* (C.L. Walk, et al., eds.). Wageningen Academic Publishers, 2016. P. 45-52.
12. 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.
13. Bello A., Dersjant-Li Y., Korver D.R. The efficacy of 2 phytases on inositol phosphate degradation in different segments of the gastrointestinal tract, calcium and phosphorus digestibility, and bone quality of broilers. *Poultry Science.* 2019. 98: 5789-5800
14. Blaabjerg K., Jørgensen H., Tauson A.H., Poulsen H.D. The presence of inositol phosphates in gastric pig digesta is affected by time after feeding a nonfermented or fermented liquid wheat- and barley-based diet. *J. Anim. Sci.* 2011. 89: 3153-3162.
15. Bohn L., Josefsen L., Meyer A.S., Rasmussen S.K. Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase. *J. Agric. Food Chem.* 2007. 55: 7547-7552.
16. Champagne E.T., Fisher M.S., Hinojosa O. NMR and ESR studies of interactions among divalent cations, phytic acid, and N-acetyl-amino acids. *J. Inorg. Biochem.* 1990. 38: 199-215
17. Cosgrove D.J. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. *Rev. Pure & Appl. Chem.* 1966. 16: 209-224.
18. Costello A.J.R., Glonek T., Myers T.C. P-nuclear magnetic resonance-pH titrations of myoinositol hexaphosphate. *Carbohydrate Resource.* 1976. 46: 159-171.
19. 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. *Brit. J. Poultry Sci.* 2004. 45: 101-108.
20. Cowieson A.J., Acamovic T., Bedford M.R. Supplementation of cornsoy-based diets with an *Escherichia coli*-derived phytase: Effects on broiler chick performance and the digestibility of amino acids and metabolizability of minerals and energy. *Poultry Science.* 2006. 85: 1389-1397.
21. 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. *Brit. J. Nutr.* 2007. 98: 745-752.
22. Cowieson A.J., Bedford M.R., Selle P.H., Ravindran V. Phytate and microbial phytase: implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability, *World's Poultry Sci. J.* 2009. 65, 401-418
23. Dersjant-Li Y, Dusel G. Increasing the dosing of a Buttiauxella phytase improves phytate degradation, mineral, energy, and amino acid digestibility in weaned pigs fed a complex diet based on wheat, corn, soybean meal, barley, and rapeseed meal, *J. Anim. Sci.* 2019a. 97:2524-2533.
24. Dersjant-Li Y., Hruba M., Evans C., Greiner R.A. Critical review of methods used to determine phosphorus and digestible amino acid matrices when using phytase in poultry and pig diets. *J. Appl. Anim. Nutr.* 2019b, 7, e2; 1-9.
25. Elkhailil E.A.I., Männer K., Borriss R., Simon O. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 2007. 48: 64-70
26. Ennis C. E., Gehring C. K., Bedford M. R., Wyatt C.L., and Wamsley K.G.S. Strategies to determine the efficacy of multiple phytase use at low activities using Ross x Ross 708 male broilers from 0 to 14 d. *J. Appl. Poultry Res.* 2020. 29: 977-994
27. Gontia-Mishra I., Tiwar S. Molecular and comparative phylogenetic analysis of phytases from fungi with their prospective applications. *Food Techn. Biotechn.* 2013. 51: 313-326.
28. Greiner R., Konietzny U. Endogenous phytate-degrading enzymes are responsible for phytate reduction while preparing beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Proces. Preserv.* 1998. 29: 321-331.
29. Greiner R., Konietzny U. Phytase for Food Application, *Food Techn. Biotechn.* 2006. 44: 125-140.
30. Greiner R., Lim B. L., Cheng Ch., Carlsson N.G. Pathway of phytate dephosphorylation by β -pro-peller phytases of different origins. *Canad. J. Microb.* 2007. 53: 488-495.
31. Rao D.E.C.S., Rao K.V., Reddy T.P., Reddy V.D. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: an overview. *Crit. Rev. Biotechn.* 2009. 29: 182-198
32. Ingelmann C.J., Witzig M., Möhring J., Schollenberger M., Kühn I., Rodehutschord M. Phytate degradation and phosphorus digestibility in broilers and turkeys fed different corn sources with or without added phytase. *Poultry Sci.* 2019. 98: 912-922.
33. Kies A.K., De Jonge L.H., Kemme P.A., Jongbloed A.W. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase in vitro studies. *J. Agric. Food Chem.* 2006. 54: 1753-1758.

34. 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: 1151-1115.
35. Leslie M.A., Moran E.T. Jr., Bedford M.R. The effect of phytase and glucanase on the ileal digestible energy of corn and soy bean meal fed to broilers *Poultry Sci.* 2007. 86: 2350-2357.
36. Li W., Angel R., Kim S.-W. Brady K., Yu S. Plumstead P.W. Impacts of dietary calcium, phytate, and phytase on inositol hexakisphosphate degradation and inositol phosphate release in different segments of digestive tract of broilers, *Poultry Sci.* 2017. 96: 3626-3637.
37. Liu N., Ru Y.J., Cowieson A.J., Li F.D., Cheng X.C.H. Effects of phytate and phytase on the performance and immune function of broilers fed nutritionally marginal diets. *Poultry Sci.* 2008. 87: 1105-1111.
38. Liu S., Chrystal P., Moss A., Selle P. Negative impacts of phytate are subject to digestible lysine: starch ratios in poultry diets. In: *28th Annual Australian Poultry Science Symposium (APSS 2017)*. Camden NSW: Poultry Research Foundation University of Sydney and World Poultry Science Association. 2017. P. 96-101.
39. 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. Techn.* 1999. 81: 177-192.
40. Maenz D.D., Classen H.L. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poultry Sci.* 1998. 77: 557-563
41. 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.
42. Morales G.A., Saenz de Rodríguez M.A, Marquez L., Diaz M., Moyano F.J. Solubilisation of protein fractions induced by *Escherichia coli* phytase and its effects on *in vitro* fish digestion of plant proteins. *Anim. Feed Sci. Techn.* 2013. 181: 54-64.
43. Mothes R., Schwenke K. D., Zirwer D., Gas, K. Rapeseed protein – polyanion interactions. Soluble complexes between the 2S protein fraction (napin) and phytic acid. *Die Nahrung.* 1990. 34. 375-385.
44. Moss A., Chrystal P., Dersjant-Li Y., Liu S., Selle P. The ranked importance of dietary factors influencing the performance of broiler chickens offered phytase-supplemented diets by the Plackett-Burman screening design, *Brit. J. Poultry Sci.* 2019. 60: 439-448.
45. Nelson T.S. The utilization of phytate phosphorus by the chick-a review. *Poultry Sci.* 1967. 46: 862-871.
46. 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.
47. Nys Y., Frapin D., Pointillart P. Occurrence of phytase in plants, animals and microorganisms. In: *Phytase in Animal Nutrition and Waste Management* (Coelho M.B. and Kornegay E.T. eds). BASF Corporation, Mount Olive, New Jersey. 1996. 213-240.
48. 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. Biotechn.* 2004. 63: 362-372.
49. Perryman K.R., Masey O'Neill H.V., Bedford M.R., Dozier W.A. 3rd methodology affects measures of phosphorus availability in growing broilers: Effects of calcium feeding strategy and dietary adaptation period length on true ileal phosphorus digestibility and predicted endogenous phosphorus losses. *Poultry Sci.* 2017. 96: 611-621.
50. Pontoppidan K., Glitsoe V., Guggenbuhl P., Quintana A.P., Nunes C.S., Pettersson D., Sandberg A.S. *In vitro* and *in vivo* degradation of myo-inositol hexakisphosphate by a phytase from *Citrobacter braakii*. *Arch. Anim. Nutrit.* 2012. 66: 431-444.
51. Qvirist L., Carlsson N.G., Andlid T. Assessing phytase activity—methods, definitions and pitfalls. *J. Biol. Meth.* 2015. 2: e16.
52. Ravindran V., Cabahug S., Ravindran G., Bryden W.L. Influence of microbial phytase on a ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. *Poultry Sci.* 1999. 78: 699-706.
53. Ravindran V., Morel P.C., Partridge G.G., Hruby M., Sands J.S. Influence of an *Escherichia coli*-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. *Poultry Sci.* 2006. 85: 82–89.
54. Sandberg A.S., Brune M., Carlsson N.G., Hallberg L., Skoglund E., Rossander-Hulthén L. Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Amer. J. Clin. Nutrit.* 1999. 70: 240-246.
55. Schlemmer U., Jany K. D., Berk A., Schulz E., Rechkemmer G. Degradation of phytate in the gut of pigs – Pathway of gastro-intestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved. *Arch. Anim. Nutrit.* 2001. 55: 255-280.
56. She Y., Li D., Zhang Sh. Methodological aspects of determining phosphorus digestibility in swine: a review. *Anim. Nutrit.* 2017. 3: 97-102.

57. Skoglund E., Näsi M., Sandberg A.-S. Phytate hydrolysis in pigs fed a barley-rapeseed meal diet treated with *Aspergillus niger* phytase or steeped with whey. *Canad. J. Anim. Sci.* 1998. 78: 175-180.
58. 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.
59. 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.
60. Selle P. H., Ravindran V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 2007. 135, 1 – 41
61. Siegert W., Zuber T., Sommerfeld V., Krieg J., Feuerstein D., Kurrle U., Rodehutsord M. Prececal amino acid digestibility and phytate degradation in broiler chickens when using different oilseed meals, phytase and protease supplements in the feed. *Poultry Sci.* 2019, 98: 5700-5713.
62. Sommerfeld V., Künzel S., Schollenberger M., Kühn I., Rodehutsord M. Influence of phytase or myo-inositol supplements on performance and phytate degradation products in the crop, ileum, and blood of broiler chickens. *Poultry Sci.* 2018. 97: 920-929.
63. Stone B.A. Cell walls of cereal grains. *Cereal Foods World.* 2006. 51: 62-65.
64. Tamim N.M., Angel R., Christman M. Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens. *Poultry Sci.* 2004. 83: 1358-1367.
65. Yao M.Z., Zhang Y.H., Lu W.-L., Hu M.Q., Wang W., Liang A.H. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 2011. 211. 1-14
66. Yi Z., Kornegay E.T., Denbow D.M. Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poult fed corn–soybean diet. *Poultry Sci.* 1996. 75: 979-990.
67. Yu S., Cowieson A., Gilbert C., Plumstead, P., Dalsgaard, S. Interactions of phytate and myoinositol phosphate esters (IP₁₋₅) including IP₅ isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *J. Anim. Sci.* 2012. 90: 1824-1832.
68. Walk C.L. Bedford M.R. Olukosi O.A. Effect of phytase on growth performance, phytate degradation and gene expression of myo-inositol transporters in the small intestine, liver and kidney of 21 day old broilers. *Poultry Sci.* 2018. 97: 1155-1162.
69. Walk C.L., Olukosi O.A. Influence of graded concentrations of phytase in high-phytate diets on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and phytate concentration in broilers from hatch to 28 D post-hatch. *Poultry Sci.* 2019. 98: 3884-3893.
70. Wodzinski R.J., Ullah A.H.J. Phytase. *Adv. Appl. Microb.* 1996. 42: 263-303.
71. Zanella I., Sakomura N.K., Rosa A.P., Figueiredo A.N., Magon L. Enzyme supplementation on digestibility of corn-soybean diets for broiler chicks. *Ars Veterinaria.* 2004. 20: 144-150.
72. Zeller E., Schollenberger M., Kühn I., Rodehutsord 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. Nutrit. Sci.* 2015. 4: 1-12.
73. Zyla K., Ledoux D. R., Garcia A., Veum T. L. An in vitro procedure for studying enzymic dephosphorylation of phytate in maize-soyabean feeds for turkey poult. *Brit. J. Nutrit.* 1995. 74: 3-17.
74. Żyła K., Mika M., Stodolak B., Wikiera A., Koreleski J., Świątkiewicz S., Towards complete dephosphorylation and total conversion of phytases in poultry feeds. *Poultry Sci.* 2004. 83: 1175-1186.
75. Żyła K., Duliński R., Pierzchalska M., Grabacka M., Józefiak D., Świątkiewicz S. Phytases and myo-inositol modulate performance, bone mineralization and alter lipid fractions in the serum of broilers. *J. Anim. Feed Sci.* 2013. 22: 56-62.

References (for publications in Russian)

1. Balaban N.P., Suleimanova A.D., Shakirov E.V., Sharipova M.P. [Histidine acid phytases of microorganisms]. *Mikrobiologiya - Microbiology.* 2018. 87: 635–648.
2. Dzhouns G. [How to choose the best phytase for livestock ration]. *Tsenovik - Price Journal* 2014. 10: 102-103.
3. Kryukov V.S., Glebova I.V., Antipov A.A. [Assessment of the action of phytases in the digestive tract and the use of phytase preparations in animal nutrition: a review]. *Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology.* 2019. 2: 19-43..
4. Trufanov O.V. *Fitaza v kormlenii sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh i ptitsy* (Phytase in the feeding of farm animals and poultry). Kiev: PoligrfInko Publ., 2011. 112 c.

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.3.5-19

New aspects in the interpretation of the role of fitase in digestion processes in productive animals: a review

¹Kryukov V.S., ²Zinoviev S.V.

¹OJSC "Kormogran", Moscow; ²Institute of Poultry Processing Industry – Branch of Federal Science Center – Research and Technological Institute of Poultry, Rzhavki village, Moscow oblast, Russian Federation

ABSTRACT. Phytase is widely used in animal feeding due to its positive effect on productivity. More than half of all publications describing the use of enzymes in animal nutrition are devoted to phytase. At the same time, researchers have questions that have not received answers. The main sections of the review: the leading role of endogenous enzymes that break down phytates, extraphosphoric action of phytase, anti-nutritional action of phytates, metabolism of phytic acid, factors affecting the initiation of dephosphorylation of phytic acid, and the use of phytase "superdoses". It is not true that phytates are digested in the gastrointestinal tract. The anti-nutritional effect of phytates is widely believed to be related to the action of phytic acid released from phytates. Phytic acid reacts with nutrients, inhibiting their absorption. Under the action of phytases, phytic acid is split into individual phosphate esters of inositol. With an increase in the depth of decomposition, the anti-nutritional effect of phytic acid decreases. The role of endogenous phytases is mistakenly diminished in comparison with exogenous ones. The concept of "extraphosphoric" action of phytase cannot be substantiated, since its only property is the hydrolysis of phosphoric esters of inositol. It has been proven that the inhibition of phytic acid catabolism occurs at the level of dephosphorylation of inositol- (1, 2, 5, 6) -tetrphosphate.

Keywords: phytase, phytic acid catabolism, anti-nutritional effect of phytates, extraphosphoric effect of phytase.

Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2021, 3: 5-19.

Поступило в редакцию: 16.08.2021

Получено после доработки: 13.09.2021

Вклад авторов: Авторы в равной степени участвовали в подготовке рукописи, пересмотру ее содержания и утверждению окончательной версии, представленной для публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Крюков Валерий Сергеевич, д.б.н., тел.: +7(926)532-40-70; kryukov.v.s@mail.ru;
Зиновьев Сергей Владимирович, к.с.-х.н., с.н.с., тел.:+7(920)733-46-13; neollit_13@mail