УДК577.15.08, 579.222

А. Д. Сулейманова, А. А. Тойменцева, Е. О. Михайлова, М. Р. Шарипова

ОПТИМИЗАЦИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ

Ключевые слова: фитаза, фитазная активность, инозитолфосфаты.

Исследовано три метода определения фитазной активности, основанных на количественном определении высвобождающихся фосфатов и определении уменьшения концентрации фитата в процессе реакции. Установлено, что оптимальным методом измерения активности фитазы в клеточномлизате P. vagans 3.2 является метод на основе определения содержания свободных фосфатов с образованием фосфорномолибденовокислого аммония.

Keywords: phytase, phytase assay, inositolphosphates.

Three different methods based on quantification of the liberated phosphates, as well as quantification of the decrease in phytate concentration during the enzymatic reaction were compared. Quantification ofthe liberated phosphates with ammonium-molybdate method was found to be the best way todetermine total phytate-degrading activity of P. vagans 3.2 phytase in crude extract.

Введение

Фитиновая кислота (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат) – это органическое соединение, состоящее из шестиатомного спирта инозитола, гидроксильные группы которого связаны с шестью остатками фосфорной кислоты. Фитиновая кислота накапливается в семенах растении вместе с другими запасными веществами, такими как крахмал и липиды, в виде солеи одно- и двухвалентных катионови включает около 80% от общего фосфора семян [1].

В рационах сельскохозяйственных животных высока доля такого сырья, как пшеница, ячмень, рожь и других зерновых культур, богатых питательными веществами и содержащих значительное количество фитиновой кислоты[2]. Жвачные животные разрушают соли фитиновой кислоты, входящие в состав кормов, с помощью ферментов фитаз, продуцируемых микрофлорои рубца [3]. Фосфор, которыи высвобождается при гидролизе фитатов, используется как микрофлорои рубца, так и организмом хозяина. Такие животные как свиньи, куры и рыбы не способны метаболизировать фитиновую кислоту в связи с отсутствием ферментов в их желудочно-кишечном тракте. Чтобы удовлетворить потребности этих животных в фосфоре, в корма добавляют фосфаты, что существенно увеличивает стоимость кормов и способствует фосфатному загрязнению окружающеи среды [4].

В настоящее время фитазы используют в качестве кормовых добавок для животных с однокамерным желудком, поскольку этиферменты не только увеличивают доступность фосфора, но и улучшают усвоение кальция, микроэлементов, белков, аминокислот, а также повышают энергетическую ценность кормов [5]. Биотехнологи проводят постоянный поиск эффективных продуцентов новых фитаз для совершенствования индустрии кормления сельскохозяйственных животных. Таким образом, в виду высокой практической значимости фитаз в агробиотехнологии, они интенсивно исследуются учеными: изучают их свойства, стабильность под действием высоких температур, протеолитических ферментов, экстремальных значений pH и т.д.[6]. Описано множество методик определения фитазной активности *invitro*, однако, универсальной методики не существует и для каждого нового объекта необходимо подбирать оптимальный метод.

В данной работе проведена оптимизация метода определения активности фитазы клеточного лизатаграмотрицательной энтеробактерии *Pantoeavagans* 3.2, выделенной из почв Республики Татарстан и идентифицированной молекулярно-генетическими методами.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явился фитат-гидролизующий штамм *Pantoeavagans* 3.2, выделенный из почв Республики Татарстан [7]. Культивирование бактерии проводили на среде LB [8] в колбах объемом 1000 мл при соотношении объема среды к объему колбы 1 : 5 на вибростенде для культивирования (B. Braun, Германия) с интенсивностью качания 200 об/мин при температуре 37°C. Посевным материалом служил 12-часовои инокулят клеток. Контроль за ростом культуры осуществляли по изменению оптическои плотности, которую определяли нефелометрически при длине волны 590 нм.

Для получения клеточного лизата клетки бактерий освобождали от культуральнои жидкости центрифугированием в течение 10 мин при 8000 g, подвергали процедуре замораживания-оттаивания в морозильнои камере при –80°C и при комнатнои температуре соответственно, ресуспендировали в 20 мMNa-ацетатном буфере, pH 4.5 и разрушали ультразвуком при 20–50 кГц. Клеточныйлизат центрифугировали 30 мин при 15000 об/мин, супернатант использовали для определения фитазной активности.

Определение фитазной активности:

Метод 1–Для определения содержания мио-инозитол фосфатовк реакционной смеси, содержащей 1.25 мл 3.5ммольфитата натрия в 100 мMNa-ацетатном буфере, pH 4.5 добавляли 10 мкл

раствора фермента. Реакцию проводили при 37°С. Из реакционной смеси отбирали 100 мкл образца и останавливали реакцию нагреванием (95°С, 10 мин).Количественный анализ продуктов гидролиза фитата проводили AOAC-методом [9]с помощью ионообменной обращено-фазнойжидкостной хроматографии на колонке Ultrasep ES 100 RP18 как описано в методике [10]. Анализируемый препарат разводили в 20 раз и подкисляли добавлением 60 мл25 мМHCl. Препарат наносили на колонку (0.7 х 9 х 15 см), содержащую ионообменную смолуAG1-98 100-200. Колонку промывали 25 мл дистиллированной воды и 25 мл 25мМHCl. Затем продукты гидролиза фитатаэлюировали 20 мл 2М HCl. Полученный элюат концентрировали в вакуумном испарителе и растворяли в 1 мл воды. 20 мкл образца подвергали хроматографии на колонке Ultrasep ES 100 RP18 (2 х 9 х 250 мм). Хроматографию проводили при 45°С со скоростью 0.2 мл/мин. Элюциюмио-инозитолфосфатов проводили раствором, содержащим муравьиную кислоту: метанол : воду : гидроксид тетрабутиламмония в соотношении 44 : 56 : 5 : 1.5, pH 4.25. Раствор стандартных мио-инозитолфосфатов (Ин3Ф – Ин6Ф) использовали для калибровки колонки.

Метод 2 – Определение содержания свободных фосфатов с образованием молибденовой сини[11]. 100 мкл раствора фермента вносили в 100 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкмоль фитата натрия в 100 мМNa-ацетатном буфере, pH 4.5 и инкубировали 30 мин при 37°С. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 80 мМ раствора молибдата натрия в 2.5Н H_2SO_4и 50 мкл раствора двухлористого олова. Раствор двухлористого олова предварительно готовили следующим образом: к 10 г $SnCl_2$ добавляли 25 мл концентрированной соляной кислоты и нагревали на водяной бане до полного растворения, затем разводили в 200 раз дистиллированной водой и использовали для постановки реакции.

Оптическую плотность опытной пробы измеряли на спектрофотометре Smart Spec Plus (BioRad, USA) против контрольной при 700 нм в 1 см кювете.За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющего фитат натрия с образованием 1 мкмоля неорганического фосфата за одну минуту.

Метод 3 - Определение содержания свободных фосфатов с образованием фосфорномолибденовокислого аммония по методу Грайнера [12]. Реакционная смесь содержала 100 мкл 10 мМфитат натрия, 250 мкл 100 мМNa-ацетатного буфера, pH 4.5, 5-50 мкл раствора фермента. Смесь инкубировали в течении30 мин при 37°С, реакцию останавливали добавлением 1.5 мл свежеприготовленного реагента следующего состава: 10 мМ гептамолибдат аммония, раствор 5Н H_2SO_4 и ацетон в соотношении 1:1:2.

Оптическую плотность опытной пробы измеряли на спектрофотометре SmartSpecPlus (BioRad, USA) против контрольной при 355 нм в 1 см кювете. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющего фитат натрия с образованием 1 мкмоля неорганического фосфата за одну минуту.

Результаты и обсуждения

Измерение фитат-гидролизующей активности проводилипутем количественного определения высвобождающихся фосфатов и определением уменьшения концентрации фитата в процессе ферментативной реакции. Сравнивали результаты трех методов измерения фитат-гидролизующей активности клеточного лизата*Pantoeavagans* 3.2.

Для разделения продуктов гидролиза фитата и определения концентрации инозитолфосфатов мы использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию. Этот метод позволяет проследить за уменьшением концентрации субстрата – фитата в реакционной смеси в процессе ферментативного гидролиза. Нами показано, что за восемь часов инкубации клеточноголизата*Pantoeavagans*с субстратом в реакционной смеси наблюдалось снижение концентрации инозитолгексафосфата (фитата) с 3.5 мМ до 2 мМ (рис. 1).При этом после второго часа инкубации в смеси обнаруживали инозитолпентафосфат, концентрация которого увеличивалась и к восьмому часу достигала 1.3 мМ, тогда как концентрация фитата снижалась в 1.5 раза (рис. 1).

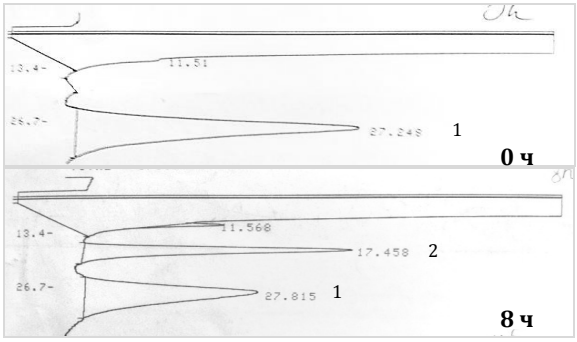

Рис. 1 – HPLC-анализ продуктов гидролиза фитатафитазой *P. vagans*: 1 – пик, соответствующий фитату натрия; 2 – пик, соответствующий инозитолпентафосфату

Используемый метод позволилнам определить уменьшение концентрации фитата натрия в процессе ферментативного гидролиза. Однако для рутинного определения фитазной активности данный метод не подходит, поскольку является трудоемким, дорогостоящим и требует большого количества времени на пробоподготовку.

Метод 2 основан на количественном определении содержания неорганических фосфатов (PO_4), образующихся в результате гидролизафитата натрия, путем их связывания молибдатом натрия и восстановлением двухлористым оловом с образованием молибденовой сини (ГОСТ).При использовании данного метода фитазной активности в клеточном лизате *P. vagans*нами не обнаружено: контрольная и опытная пробы не имели

достоверного различия. Диапазон чувствительности этого метода (0,05-0,40 мкмоль/мл неорганического фосфата) не позволил определить активность бактериального фермента фитазы *P. vagans* 3.2.

Метод 3 основан на способности неорганических фосфатов в кислой среде образовывать с молибдатом аммония соединение желтого цвета – фосфорномолибденовокислый аммоний. В раствор добавляли ацетон, поскольку при его содержании меньше 50% вероятно образование коллоидного раствора.Диапазон чувствительности метода находится в пределах 5-600 наномоль фосфата, что позволило произвести измерение фитазной активности в клеточномлизате *P. vagans* 3.2. Она составила 0.097 ед.акт./мл.

Измерение свободных фосфатов в реакционной смеси, образовавшихся в процессе гидролиза фитата, является более точным методом измерения фитазной активности, чем определение снижения концентрации субстрата (фитата). При использовании метода 3 показано, что высвобождение фосфатов происходит линейно (рис. 2).

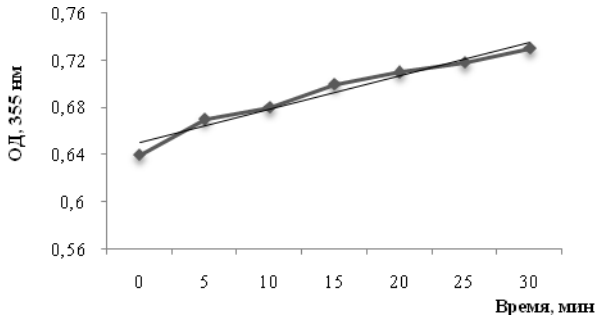

Рис. 2 – Высвобождение фосфатов от молекулы фитата в процессе его гидролиза фитазой *P. vagans* 3.2

Таким образом, оптимальным для измерения активности фитазы в клеточномлизате*P. vagans* 3.2. нами выбран метод на основе определения содержания свободных фосфатов с образованием фосфорномолибденовокислого аммония.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки России□ скои□ Федерации, соглашение N 14.A18.21.0575 от 10.08.2012 и грантом РФФИ 12-08-00942а.

Литература

1. А.И. Ахметова, А.Д. Мухаметзянова, М.Р. Шарипова,*Учен.зап.Казан.ун-та. Сер. Естеств. науки*, **154**, 2, 103–110 (2012).
2. V.Ravindran, G.Ravindran, S.Sivalogan,*Food Chemistry*,**50**, 2, 133–136 (1994).
3. Н.М. Замалютдинова, И.Р. Галиева, А.О. Арапова, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова,*Вестник Казанского технологического университета*, **16**,191-194 (2013).
4. А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова,*Микробиология*, **81**, 3, 291-301 (2012).
5. S. Leesen, H. Namkung, M. Cottrill, C.W. Forsberg,*Can. J. Anim. Sci.*,**80**, 3, 527–528 (2000).
6. X.G. Lei, J.D. Weaver, E. Mullaney, A.H. Ullah, M.J. Azain,*Annual Review of Animal Biosciences*, **1**, 283-309 (2013).
7. А.Д. Сулеи□манова, Ю.В. Данилова, Р. Граи□нер, М.Р. Шарипова,*Биоорганическая химия*, **39**, 4,424–429 (2013).
8. J. Sambrook, E.F. Fritsch, S.T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989, 2344 p.
9. Association of Official Analytical Chemists. In *Official Methods of Analysis, 15th ed.*,Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, 1990, 800-801.
10. A.-S. Sandberg, R. Ahderinne,*J. Food Sci.*,**51**, 547-550 (1986).
11. ГОСТ Р 53360-2009 Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности фитазы,Государственный стандарт от 01 января 2010 года.
12. R. Greiner, U. Konietzny, K.D. Jany,*Arch. Biochem. Biophys.*,**303**, 107–113 (1993).

© **А. Д. Сулейманова –** асп. каф. микробиологии К(П)ФУ; **А. А. Тойменцева -** к.б.н., н.с. каф. микробиологии К(П)ФУ; **Е. О. Михайлова –** к.б.н., доц. каф. БСМЭ КНИТУ, katyushka.glukhova@gmail.com; **М. Р. Шарипова -** д.б.н., проф. каф. микробиологии К(П)ФУ, marsharipova@gmail.com.