

Введение Фитиновая кислота (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексафосфат) – это органическое соединение, состоящее из шестиатомного спирта инозитола, гидроксильные группы которого связаны с шестью остатками фосфорной кислоты. Фитиновая кислота накапливается в семенах растений вместе с другими запасными веществами, такими как крахмал и липиды, в виде солей одно- и двухвалентных катионов 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 микрофлорой рубца [3]. Фосфор, который высвобождается при гидролизе фитатов, используется как микрофлорой 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 окружающей среды [4]. В настоящее время фитазы используют в качестве кормовых добавок для животных с однокамерным желудком, поскольку эти ферменты 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 агробiotехнологии, 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 *in vitro*, однако, универсальной методики не существует и для каждого нового объекта необходимо подбирать оптимальный метод. В данной работе проведена оптимизация метода определения активности фитазы клеточного лизата грамотрицательной энтеробактерии *Pantoea vagans* 3.2, выделенной из почв Республики Татарстан и идентифицированной молекулярно-генетическими методами. Материалы и методы исследования Объектом исследования явился фитат-гидролизующий штамм *Pantoea vagans* 3.2, выделенный из почв Республики Татарстан [7]. Культивирование бактерий 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-часовой инокулят клеток. Контроль за ростом культуры осуществляли по изменению оптической плотности, которую определяли нефелометрически при

длине волны 590 нм. Для получения клеточного лизата клетки бактерий освобождали от культуральной жидкости центрифугированием в течение 10 мин при 8000 g, подвергали процедуре замораживания-оттаивания в морозильной камере при  $-80^{\circ}\text{C}$  и при комнатной температуре соответственно, ресуспендировали в 20 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4.5 и разрушали ультразвуком при 20–50 кГц. Клеточный лизат центрифугировали 30 мин при 15000 об/мин, супернатант использовали для определения фитазной активности.

Определение фитазной активности: Метод 1 – Для определения содержания миоинозитол фосфатов в реакционной смеси, содержащей 1.25 мл 3.5 ммоль фитата натрия в 100 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4.5 добавляли 10 мкл раствора фермента. Реакцию проводили при  $37^{\circ}\text{C}$ . Из реакционной смеси отбирали 100 мкл образца и останавливали реакцию нагреванием ( $95^{\circ}\text{C}$ , 10 мин). Количественный анализ продуктов гидролиза фитата проводили АОАС-методом [9] с помощью ионообменной обращено-фазной жидкостной хроматографии на колонке Ultrasep ES 100 RP18 как описано в методике [10].

Анализируемый препарат разводили в 20 раз и подкисляли добавлением 60 мл 25 мМ HCl. Препарат наносили на колонку (0.7 x 9 x 15 см), содержащую ионообменную смолу AG1-98 100-200. Колонку промывали 25 мл дистиллированной воды и 25 мл 25 мМ HCl. Затем продукты гидролиза фитата элюировали 20 мл 2 М 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 x 9 x 250 мм). Хроматографию проводили при  $45^{\circ}\text{C}$  со скоростью 0.2 мл/мин. Элюцию миоинозитолфосфатов проводили раствором, содержащим муравьиную кислоту: метанол : воду : гидроксид тетрабутиламмония в соотношении 44 : 56 : 5 : 1.5, pH 4.25. Раствор стандартных миоинозитолфосфатов (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 мМ Na-ацетатном буфере, pH 4.5 и инкубировали 30 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 80 мМ раствора молибдата натрия в 2.5 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и 50 мкл раствора двухлористого олова. Раствор двухлористого олова предварительно готовили следующим образом: к 10 г  $\text{SnCl}_2$  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 мкмоль 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 мМ фитат натрия, 250 мкл 100 мМ Na-ацетатного буфера, pH 4.5, 5-50 мкл раствора фермента. Смесь инкубировали в течении 30 мин при 37°C, реакцию останавливали добавлением 1.5 мл свежеприготовленного реагента следующего состава: 10 мМ гептамолибдат аммония, раствор 5Н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 мкмоль неорганического фосфата за одну минуту. Результаты и обсуждения

Измерение фитат-гидролизующей активности проводили путем количественного определения высвобождающихся фосфатов и определением уменьшения концентрации фитата в процессе ферментативной реакции. Сравнивали результаты трех методов измерения фитат-гидролизующей активности клеточного лизата *Pantoea vagans* 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 клеточного лизата *Pantoea vagans* 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).

10 ч 218 ч

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

Используемый метод позволил нам 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<sub>4</sub>), образующихся в результате гидролиза фитата натрия, путем их связывания молибдатом натрия и восстановлением двуххлористым 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 клеточном лизате *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 клеточном лизате *P. vagans* 3.2. нами выбран метод на основе определения содержания свободных фосфатов с образованием фосфорномолибденовокислого аммония.