



Vnitřní tepelná stabilita fytázy další kritérium pro dobrou fytázu

Souhrn

Biochemická charakteristika fytázy, jako je pH profil, rezistence na pepsin, rychlost a afinita, může poskytnout informace o potenciální účinnosti fytázy *in vivo*. Zaměření na zlepšení vnitřní tepelné stability bylo motivováno trhem a je součástí výběrových kritérií.

Úvod

Exogenní přidaná fytáza v krmivech je v praxi již více než 25 let. Používá se k uvolňování fosforu (P) vázaného na fytát přítomný v surovinách, ke snížení nákladů na krmivo snížením množství přidaného anorganického P a ke snížení koncentrace fytátu, což je dobře známý antinutriční faktor. Zároveň se zlepšuje udržitelnost životního prostředí, protože se snižuje vylučování P v životním prostředí. Roste také povědomí o tom, že zdroje anorganického P nejsou nevyčerpatelné. Jelikož jsou komerčně dostupné různé fytázy, je důležité si uvědomit, která kritéria jsou důležitá pro správnou volbu.

Profil pH a odolnost fytázy proti pepsinu

Tato kritéria jsou běžně používána jako první rychlý screening fytáz. Je všeobecně známo, že fytát musí být v roztoku, aby exogenní fytáza mohla hydrolyzovat fosfátové skupiny. Fytát je z velké části rozpustný při hodnotách pH nižších než 4,0 (žaludek), zatímco při vyšším pH vytváří komplexy s kladně

nabitými ionty a aminokyselinami, které jsou nerozpustné a pro fytázu nedostupné. Proto se jako lepší ukázala být fytáza s vysokou aktivitou v celém rozsahu kyselého pH od pH 2 do 4. Protože fytázy fungují v žaludku, je důležitým parametrem také screening na takovou fytázu, která není náchylná k degradaci pepsinem.

Rychlost hydrolyzy fytátu a afinita k fytátu

Klíčovým kritériem pro výběr fytázy je rychlost hydrolyzy fytátu. Cílem je dosáhnout maximální rychlosti, aby bylo dosaženo rychlé degradace fytátu. To nejen zajišťuje vysoké uvolňování P v krátkém čase, ale degradace fytátu také vede k uvolňování vázaných mikroprvků a proteinů (aminokyselin), což zvyšuje jejich stravitelnost. Tato maximální rychlost (V_{max}) se stanovuje v takzvaných Michaelis Menten kinetických studiích, ve kterých se za podmínek *in vitro* měří rychlost degradace fytátu v závislosti na zvyšujících se hladinách fytátu (obr. 1). Jak je však zobrazeno na obr. 1, dvě fytázy, které mají podobnou V_{max} , mohou mít nižší rychlost působení, když se hladiny fytátu snižují v důsledku působení fytázy. To je způsobeno rozdílem v afinitě (K_m) fytázy k fytátu. Afinita, která je definována jako koncentrace fytátu, při které se rychlost jeho degradace rovná polovině její maximální rychlosti, naznačuje, jak dlouho lze tuto vysokou rychlost

udržet, když koncentrace fytátu klesá. Jak vyplývá z měření *in vivo*, je nízká K_m (tedy vysoká afinita) pro fytázu výhodou, protože vede k prodloužené vysoké rychlosti degradace fytátu, a tedy k vyšší zápočtové hodnotě P. Převáděno do praxe: když ptáci konzumují krmivo, počáteční hladina fytátu během hydrolyzy v žaludku poklesne, a sníží se také rychlost odbourávání fytátu. Fytáza s vyšší afinitou (nižší K_m) bude však schopna udržovat vysokou rychlost degradace fytátu po delší dobu a bude tak mít vyšší zápočtovou hodnotu P.

Snaha o fytázu s vnitřní tepelnou stabilitou

První fytázy komercializované před 20–30 lety byly během peletování poměrně citlivé na teplo, dokonce i když byly chráněné obdukcí, takže se rozšířila aplikace fytáz nástřikem až po peletizaci (PPLA). Vedle nákladů na instalaci PPLA zde bylo i riziko nesprávné funkce zařízení, které vyžaduje vysokou úroveň údržby a také kontroly kvality, což vše je přítěží jak z hlediska řízení, tak i technologie výroby krmiv.

Z tohoto pohledu vzbudila zájem informace o vnitřní tepelné stabilitě fytáz. Zvýšení vnitřní tepelné stability, které umožňuje peletování při teplotě alespoň 85 °C, bylo řešením pro termostabilitu za normálních podmínek peletování. Když však lze pomocí technologie potahování zvýšit termostabilitu na 90 °C (nebo dokonce 95 °C), je to již



Lode Nollet, MSc., PhD.,
Huvepharma

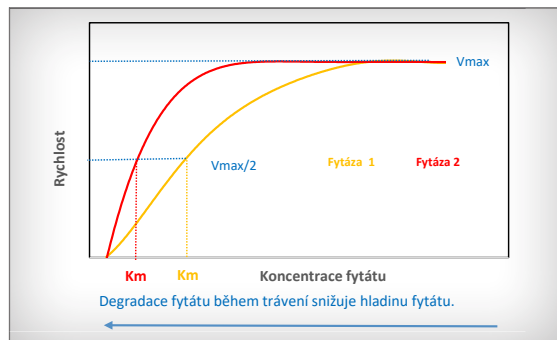
reálná alternativa aplikace kapalných fytáz přes PPLA.

V období let 2017–2020 bylo provedeno více peletovacích pokusů v Evropě (na pěti různých zkušebních místech) a v USA (na pěti různých zkušebních místech) za účelem posouzení tepelné stability nově vyvinuté vnitřní tepelně stabilní fytázy, nepotažené G (granulované) a potažené CT verze. Bylo rozhodnuto, aby pokusy proběhly na různých místech tak, aby byla fytáza testována za široké škály různých podmínek peletování (včetně ovlivňujících faktorů, jakými jsou výrobní technologie, složení krmiva, rychlost chlazení a další). Protože univerzální definice stability uvádí, že „stability je dosaženo, když je zachována aktivita účinné látky > 80 % původní hodnoty“, tak je vidět, že nově vyvinutá fytáza může být v granulované formě (G) použita při 85 °C (obr. 2) a její potahovaná verze (CT) vydrží teploty peletování až 90 °C, a dokonce 95 °C s přijatelnými (25%) ztrátami aktivity (obr. 2).

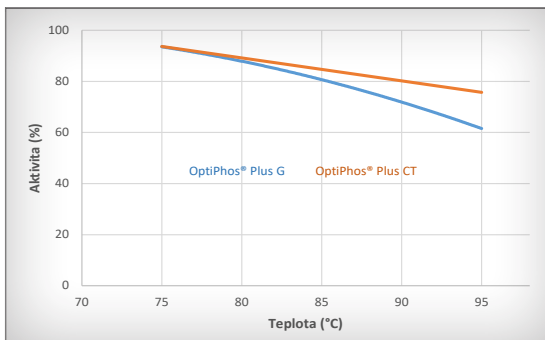
Závěr

Vedle screeningu optimálních biochemických charakteristik fytázy, jako je pH profil, odolnost proti pepsinu a rychlost/afinita, se důležitým předpokladem stala vnitřní tepelná stabilita fytázy, což jí umožňuje dosáhnout tepelné stability při peletizaci do 85 °C a v potahované formě dokonce až do 95 °C.

Lode Nollet, MSc., PhD.
Huvepharma NV



Obr. 1 – Rychlost degradace fytátu 2 fytázami vykazujícími stejnou maximální rychlost (V_{max}), ale odlišnou afinitu (K_m) k fytátu



Obr. 2 – Průměrná aktivita granulované a potahované formy fytázy s vnitřní tepelnou stabilitou v průběhu peletovacích studií (2017 až 2020, data z EU a USA)

Nyní registrován v EU

OptiPhos[®] Plus



BEAT
the **HEAT**

Dodává:

BIOFERM[®]

BIOFERM CZ, spol. s r.o., Banskobystrická 55, 621 00 Brno, Czech Republic
tel: +420 541 422 550, fax: +420 545 247 600, bioferm.cz@bioferm.com, www.bioferm.com

Vyrábí:

HUVEPHARMA[®]