

ПЕРЕОЦЕНКА МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ФИТАЗЫ В ПИТАНИИ ЖИВОТНЫХ

©2021 г. В. С. КРЮКОВ¹, И. В. ГЛЕБОВА²,
С. В. ЗИНОВЬЕВ³

¹ ООО «Кормогран», «Сколково», Москва,

² Курская ГСХА, Курск,

³ ВНИТИП, Сергиев Посад, Московская обл.

I. Введение. II. Пути превращения фитиновой кислоты. III. Факторы, влияющие на дефосфорилирование фитиновой кислоты. IV. Эффективность эндогенных и экзогенных фитаз. V. Антипитательное действие фитатов. VI. Экстрафосфорный эффект фитаз. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Фитаты, резервная форма фосфора в семенах, из которых в результате активации фитаз при прорастании семян высвобождается неорганический фосфат для использования его растущими растениями. Нежвачные животные недостаточно переваривают фитаты, содержащиеся в кормах в связи с низкой активностью фитаз в ЖКТ и ограниченной доступностью фитатов для действия ферментов. Понятие «фитаты», включает множество веществ, которые объединяет присутствие в их составе аниона ФК или D-мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексаксидигидроортофосфорной кислоты. Ферменты, расщепляющие ФК, называют гидролазами мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексаксидигидроортофосфорной кислоты или короче: фитазами. Комплекс растительных фитатов включает в основном калиевые, кальциевые и магниевые соли ФК. Независимо от абсолютной концентрации фитатов в зерне злаков, относительная доля связанного с ними фосфора находится диапазоне 61–72% от общего; в продуктах переработки

Принятые сокращения: ФК – фитиновая кислота; ИФ₆ – D-мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексаксидигидроортофосфорной кислоты; ИФ₅ – ИФ₁ – низшие фосфатные эфиры инозитола; Ф – ортофосфат; ИФ – инозитолфосфаты; И – инозитол; БАВ – биологически активные вещества; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт.

Адрес для корреспонденции: kryukov.v.s@mail.ru

масличных культур этот диапазон несколько шире [1–3]. Каждая фосфатная группа ФК обладает двумя атомами водорода, способными к диссоциации, при этом они проявляют не одинаковые кислотные свойства: рК от 1,5 до 10 [4]. Механизм взаимодействия анионов ФК с катионами металлов и свойства образующихся в результате реакций веществ изучены более полно по сравнению с органическими веществами [5–8]. Установлено, что превышение молярного отношения ФК к металлам ведёт к увеличению образования растворимых фитатов со стехиометрией 1:1, тогда как избыток катионов вызывает образование нерастворимых фитатов [9] с низкой доступностью для действия фитаз. При молярном соотношении марганца, цинка, меди, кобальта и аниона ФК в диапазоне от 1:2 до 1:5 происходит образование нерастворимых солей, выпадающих в осадок [10]. В тоже время очень высокое или низкое соотношение катионов металлов: ФК увеличивает долю растворимых фитатов [11, 12]. Добавление в среду ионов хлора приводит к связыванию одной молекулой ФК до 6 ионов металла [13]. Одновременное присутствие в среде более одного типа металлов увеличивает связывание ФК и образование нерастворимого осадка [14]. Кислотность среды является определяющим фактором, влияющим на растворимость: при повышении рН до 4–5 она снижается, хотя фитат магния остаётся растворимым при рН до 7,5 [12, 15]. В среде с рН ниже 1,1 ФК имеет нейтральный заряд, поэтому она слабоактивна, приближение среды к рН 2 приведёт к ионизации 3-х фосфатных групп, дальнейшее повышение рН приводит к потере последующих протонов [4, 8]. В результате анион ФК на протяжении всего ЖКТ способен сохранять отрицательный заряд и вступать в реакции с катионами. В желудке лизин, гистидин, аргинин и содержащие их белки и полипептиды могут образовывать бинарные комплексы «белок–ИФ₆», тормозящие переваривание протеина [16–19]. Связывание фитиновой кислотой положительно заряженных аминокислот ограничивает их всасывание. Имеются доказательства, что белки бобовых растений, в которых высокая доля основных аминокислот, более активно связывают ФК, по сравнению с белками пшеницы, содержащими мало положительно заряженных аминокислот [20, 21]. При увеличении рН до 5,5 и более, то есть в кишечнике, в связи с превышением изоэлектрической точки белка бинарные комплексы в присутствии би-, тривалентных катионов распадаются, и молекула белка приобретает отрицательный заряд. В дальнейшем происходит образование тройных комплексов: «белок–катион–анион ФК», которые недоступны действию протеаз [22]. В результате выше указанных превращений образуются новые фитаты,

номенклатура которых многократно шире по сравнению с потребляемыми с кормом [7, 22–24]. Действие на них фитаз изучено слабо. Большая часть имеющихся знаний получена при изучении статических моделей *in vitro*, которые сложно переносить на животных. ЖКТ представляет собой динамичную систему, характеризующуюся перемещением содержимого, изменениями состава, pH среды, появлением новых веществ в результате переваривания. Проблема усугубляется ещё и тем, что ФК в ЖКТ подвергается действию фитаз, которые ведут к образованию метаболитов ФК, с меньшим содержанием фосфатных групп, и изменёнными физико-химическими свойствами [25].

II. ПУТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ ФИТИНОВОЙ КИСЛОТЫ.

Основные пути превращения мио-инозитолгексаксидигидрофосфорной кислоты представлены на схеме (рис. 1).

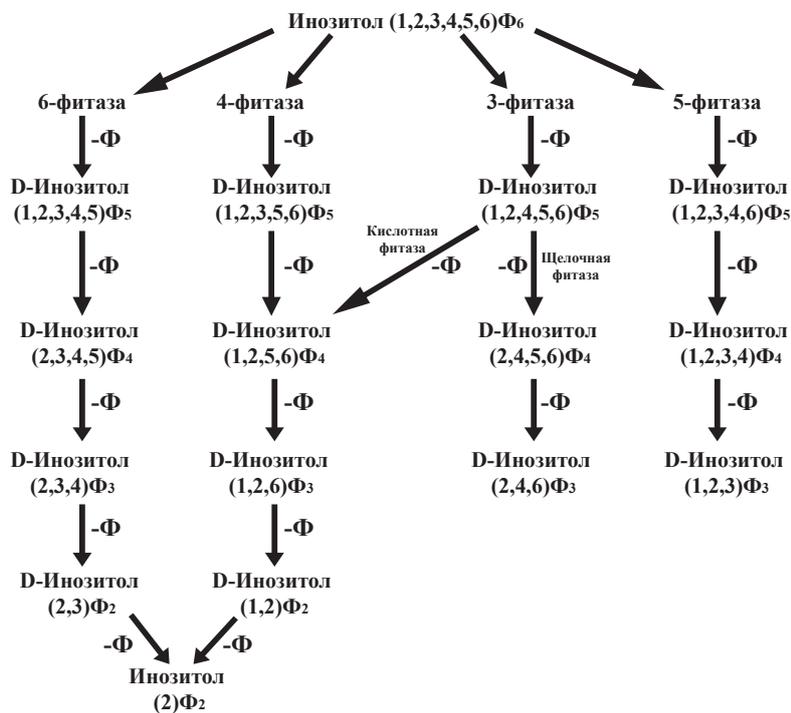


Рис. 1. Основные пути катаболизма фитиновой кислоты [26–28].

Конечными продуктами катаболизма ИФ₆ в большинстве случаев являются ортофосфат, инозитолмонофосфат и реже инозитол [29]. Фитазы различаются по кинетике их действия не только на ИФ₆, но и на низшие фосфатные эфиры инозитола: ИФ₅₋₂ [24, 30].

Наиболее распространены и изучены гистидиновые кислые фитазы, которые функционально различаются по номеру углеродного атома в кольце мио-инозитола, с которого инициируется отщепление фосфатной группы. Постадийное отщепление фосфатных групп сопровождается появлением фосфора, доступного для использования растениями и животными, и образованием низших фосфатных эфиров инозитола с повышенной растворимостью: у мио-инозитолгексафосфата в тонком кишечнике она составляет 2%, – с уменьшением количества фосфатных групп с 5 до 2 она возрастает до 7; 8; 31 и 75%, соответственно [31], в результате повышается доступность метаболитов для действия ферментов. Ещё раньше было установлено, что их растворимость зависит от концентрации катионов металлов и свободных аминокислот, обладающих хелатирующими свойствами [10–12, 32]. Полагают, что первые три стадии дефосфорилирования ФК: ИФ₆ → ИФ₄ играют ведущую роль в создании условий для полного её гидролиза. С сокращением числа фосфатных групп в молекуле ФК падают её отрицательный заряд и способность к связыванию других питательных веществ. В расщеплении ФК также принимают участие щелочные фосфатазы и фитазы [33, 34]. Недавно в опытах на цыплятах установили, что при включении в рацион 500 ед./кг гистидин кислой фитазы в тощей кишке повышалась активность эндогенной щелочной фитазы, которая расщепляет труднорастворимые фитаты двухвалентных металлов [35].

В расщеплении ФК участвуют природные фитазы зерна, фитазы, секретируемые слизистой оболочкой кишечника, микрофлорой ЖКТ и экзогенные фитазы. Известно несколько десятков ферментов, подвергающих ФК гидролизу. Велико количество коммерческих препаратов фитаз в связи с созданием новых форм с направленным изменением их свойств. Действие каждого типа фитаз и проявление максимальной активности зависит от рН среды. По этому признаку их относят к кислым или щелочным фитазам. Кислые фосфатазы обладают широкой субстратной специфичностью к фитатам, не содержащим металлов, тогда как щелочные проявляют субстратную специфичность по отношению к ФК, связанной с металлами. Классификация фитаз и их продуцентов описаны в ряде обзоров [36–39 и многих других].

В научной литературе установилось мнение, что действие фитаз при расщеплении фитатов ограничивает первая реакция дефосфорилирования независимо от типа фитазы [40]. Анализ результатов измерения концентрации метаболитов ФК в химусе ЖКТ и помёте цыплят позволил детализировать этот вывод. 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% [41]. Включение в корм 500, 1500, и 3000 ед./кг фитазы дополнительно повышало переваримость ИФ₆ на 17, 27 и 28% соответственно дозам фитазы (табл. 1).

Включение в корм 500 ед./кг экзогенной фитазы снижало в химусе зоба сумму метаболитов ИФ₅ с 1,4 до 0,8 мкмоль; в абсолютных величинах более выражено уменьшалась концентрация И(1,2,3,4,5)Ф₅, что вызвано специфическим действием 6-фитазы. Повышение её активности в корме до 1500 ед./кг обеспечило максимальное расщепление ИФ₆, – дальнейший её рост до 3000 ед./кг не оказал влияния. На основании динамики концентрации ИФ₆ и ИФ₅ у цыплят, получавших корм с активностью 500 и 1500 ед./кг 6-фитазы, можно предположить, что ограничение расщепления ИФ₆ в зобе цыплят, получавших корм с активностью 500 ед./кг фитазы, обусловлено недостаточностью фермента по отношению к субстрату. Увеличение активности фитазы в корме с 1500 до 3000 ед./кг снизило концентрацию метаболитов ИФ₃₋₅ в связи с их доступностью для действия фермента, но не изменилось содержание ИФ₆, остатки которого оставались не доступными даже при повышении активности фитазы.

С учётом активного протекания процессов пищеварения в ЖКТ, изменение концентрации ИФ₆ и его метаболитов в терминальном отделе подвздошной кишки происходило более выражено, чем в зобе (табл. 2).

Концентрация ИФ₆ в подвздошной кишке цыплят, не получавших фитазу, повысилась в 2,6 раза по сравнению с его содержанием в корме, что связано с активным перевариванием протеина и крахмала и их всасыванием, сопровождающимся ростом относительной доли сохранившихся ИФ₆ среди других перевариваемых веществ. Под действием экзогенной фитазы содержание ИФ₆ в подвздошной кишке снижалось большими темпами, чем в зобе, составляя 45, 11 и 9% соответственно испытуемым дозам. Включение в корм 500 ед./кг фитазы было недостаточным для полного расщепления ИФ₆ и его метаболитов, так как концентрация образующегося под её влиянием И(1,2,3,4,5)Ф₅ даже немного повысилась. Снижение концентрации метаболитов, сохранивших фосфатную группу у 6

Таблица 1. Влияние добавок фитазы на концентрацию изомеров ФК в зобе цыплят

Варианты	Метаболиты ИФ ₆						Снижение ИФ ₆ %
	ИФ _{3х}	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	
	Концентрация в корме, мкмоль/г сухого вещества						
	н.у.о ¹	н.у.о.	н.у.о.	0,3	0,4	0,6	11,6
	Концентрация в химусе, мкмоль/г сухого вещества						
Контроль (К)	1,1 ^b	0,6 ^a	0,8 ^c	0,3 ^a	0,7 ^a	0,4 ^a	7,9 ^a
К+Phy500*	1,5 ^a	0,3 ^b	1,2 ^a	0,2 ^b	0,4 ^b	0,2 ^b	6,2 ^b
К+Phy1500	0,8 ^c	н.д. ¹	1,0 ^{ab}	0,2 ^b	0,2 ^c	0,2 ^{bc}	5,1 ^c
К+Phy3000	0,7 ^c	н.д. ¹	0,9 ^{bc}	н.у.о ²	0,2 ^c	0,1 ^c	5,1 ^c

* – 6-фитаза Quantum Blue;

¹ – н.д., не обнаружено;² – н.у.о., ниже уровня обнаружения.^{a-c} – средние величины с одинаковыми буквами не различаются ($P < 0,05$).

Таблица 2. Влияние фитазы на концентрацию метаболитов ИФ₆ в химусе подвздошной кишки

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 ^b	н. д.	н. д.	3,8 ^{b,c}	н. д.	0,6 ^c	0,2 ^c	2,8 ^c

* – 6-фитаза Quantum Blue;

¹ – н.д., не обнаружено;

² – н.у.о., ниже уровня обнаружения;

^{a-c} – средние величины с одинаковыми буквами не различаются ($P < 0.05$)

углеродного атома инозитола, дает основание предполагать, что в метаболизме ИФ₆ участвовали природные фитазы, которые в корм не добавляли. Обращает внимание рост концентрации И(1,2,5,6)Ф₄ в 2,4 раза, исходным продуктом для которого 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. Понижение их концентрации не могло быть связано с меньшим их образованием, так как гидролиз ИФ₆ в этом случае максимально возрастал, достигнув 93–94%. Напрашивается вывод о том, что произошло ускорение превращения всех метаболитов ИФ₅ в ИФ₄ [41, 42]. Это может быть связано с тем, что гистидин кислые фитазы после отщепления первой фосфатной группы от ИФ₆ подвергают гидролизу образовавшиеся метаболиты [43]. Кроме того, растворимость катаболитов, образующихся после отщепления первой и последующих фосфатных групп, повышается, что облегчает их дальнейшее дефосфорилирование. И(1,2,4,5,6)Ф₅ по результатам опыта 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. Любое из предположений 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.

Предположение о торможении катаболизма ИФ₆ в цепи последовательных реакций дефосфорилирования на уровне И(1,2,4,6)Ф₄ подтверждается результатами, полученными при изучении содержания суммы отдельных групп метаболитов в помёте цыплят аналогичного возраста под влиянием таких же доз кормовых фитаз [44]. Измеряли суммарную концентрацию метаболитов с одинаковым количеством фосфатных групп образующихся при превращении ФК в низшие эфиры. Содержание ИФ₆ в помёте под действием 500 ед./кг фитазы снизилась на 48% и под влиянием 1500 ед./кг – на 78%.

Таблица 3. Концентрация ИФ в корме и помёте 3-недельных бройлеров

Добавлено фитазы*, ед/кг	Живая масса в 3 недели, г/гол	Концентрация метаболитов ИФ**, мг/г				
		Корм				
		ИФ ₆	ИФ ₅	ИФ ₄	ИФ ₃	Инозитол
		11,56	0,58	Не обнаружено		
Помёт						
Контроль (К)	840	39,5	4,70	3,04	0,24	0,37
К+ Phy500	874	20,7	4,76	4,93	0,18	0,80
К+ Phy1500	882	8,8	2,73	7,30	0,26	1,23

* – 6-фитаза *Quantum Blue*;

** – Сумма стереоизомеров с одинаковым количеством фосфатных групп.

В помёте контрольной группы концентрация ИФ₄ была ниже, чем ИФ₅, что могло быть связано с недостаточным образованием ИФ₅ при низкой активности эндогенных фитаз (табл. 3).

Потребление корма с активностью 500 ед./кг фитазы не повлияло на концентрацию суммы метаболитов ИФ₅, но отчётливо повысило сумму метаболитов ИФ₄. В группе, цыплят, получавших корм, с 1500 ед./кг фитазы, концентрация ИФ₆ снизилась в 4,5 раза по сравнению с её содержанием в контрольной группе. Несомненно это 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 таблицах 1–3, 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

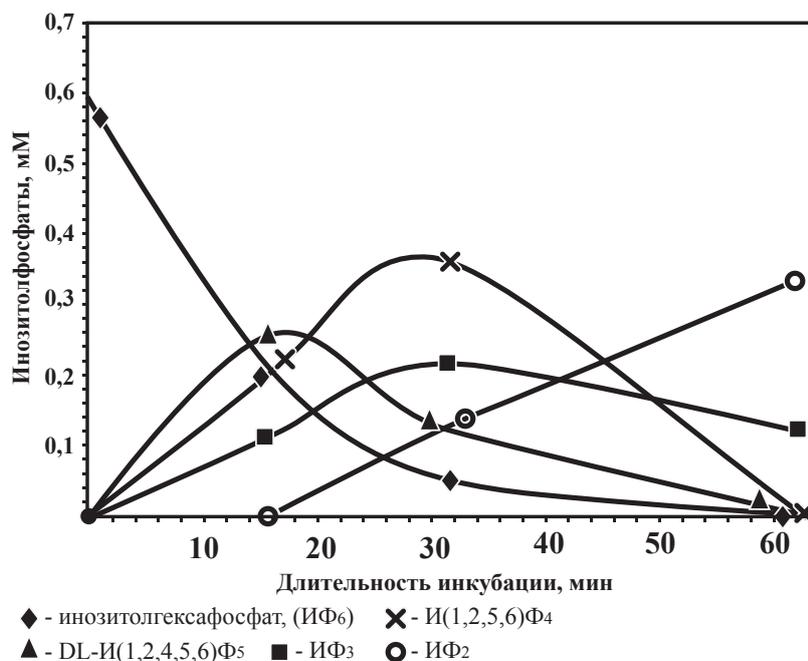


Рис. 2. Динамика метаболитов инозитолфосфата.

клеток корма, позволили подтвердить вывод о том, что дефосфорилирование ИФ₄ является лимитирующим во всей цепи последовательных реакций отщепления фосфата от исходного ИФ₆ (рис. 2) [45].

Анализ динамики исходного субстрата и его метаболитов показал, что через 15 минут после начала инкубации концентрация ИФ₆ снизилась более чем в 2 раза и через 30 минут – в 10 раз. За это же время концентрация ИФ₅ достигала максимума к 15 минуте и затем снизилась почти в 2 раза к 30-й минуте, то есть образующийся метаболит быстро превращался в ИФ₄. Его содержание активно накапливалось, сравнявшись к 15 минуте с распадающимся ИФ₆, и превысило его более чем в 2 раза к 30 минуте. Накопление *in vitro* И(1,2,5,6)Ф₄ согласуется с его максимальной концентрацией в кишечнике [41] и в помете [44], одновременно концентрация ИФ₅ и ИФ₃ оставалась ниже. Из этого следует, что в условиях *in vitro*, в которых отсутствовали ограничения доступности фермента к субстрату, проходил полный гидролиз ИФ₆ без торможения его превращения в И(1,2,4,5,6)Ф₅, то есть отщепление 1-й фосфатной группы не было лимитирующим в

цепи последовательных реакций дефосфорилирования $\text{ИФ}_6 \rightarrow \text{ИФ}_2$ процесс тормозится на стадии расщепления $\text{И}(1,2,5,6)\text{Ф}_4$.

Интересно заметить совпадение направленности изменения результатов при химическом гидролизе фитата натрия в присутствии соляной кислоты. В результате гидролиза образовалось 4 изомера ИФ_5 среди которых наибольшая доля (41%) приходилась на изомер $\text{И}(1,2,4,5,6)\text{Ф}_5$. Из 9 изомеров ИФ_4 , преобладали $\text{И}(1,2,5,6)\text{Ф}_4$ и $\text{И}(1,2,3,4)\text{Ф}_4$ [25]. Сравнивая результаты, указывающие на высокую концентрацию изомера $\text{И}(1,2,5,6)\text{Ф}_4$ в кишечнике, в помёте цыплят и при химическом гидролизе, можно предположить, что повышенный уровень этого изомера связан не только с активностью используемых фитаз, но и со стереохимическими свойствами $\text{И}(1,2,5,6)\text{Ф}_4$, обуславливающими его устойчивость. Дальнейшие исследования показали, что включение в рацион фитазы повышало катаболизм ИФ_6 во всех сегментах ЖКТ. Проявление её активности повышалось с увеличением содержания в корме фитатов и падало с ростом концентрации кальция. Эти факторы влияли на профиль низших эфиров ФК [46].

III. ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИНИЦИАЦИЮ ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ФК

Ряд работ, в которых указывают, что дефосфорилирование ИФ_6 в ЖКТ тормозит отщепление первой фосфатной группы, не создаёт противоречия выше приведенному заключению о торможении катаболизма ИФ на уровне дефосфорилирования $\text{И}(1,2,5,6)\text{Ф}_4$, если процесс оценить с учётом ранее приведенных данных [41, 44]. Вывод о торможении первого этапа дефосфорилирования справедлив, но он обусловлен не кинетикой реакций гидролиза ИФ_6 . Результаты исследований зависят от методологии проведения исследований [47, 48]. В большинстве случаев торможение обусловлено количественной недостаточностью фермента по отношению к субстрату или же ограниченной доступностью ИФ_6 [41, 44]. Установлено влияние не только структуры зерна на проявление активности фитазы, но и зависимости от вхождения ФК в состав других веществ. Так, из пшеницы были выделены чистые глобиды, содержавшие 40% ФК и 46% белка, а также калий, магний, кальций. Кинетика реакций дефосфорилирования ФК в составе глобидов показала, что K_m и $V(\max)$ были на 29 и 37% ниже по сравнению с константами, установленными при использовании в качестве субстрата свободной ФК. Расщепление ИФ_6 под влиянием природной фитазы, выделенной из пшеницы, у обоих субстратов инициировалось как у 3, так и у 6 углеродных атомов инозитола [26].

Стенки клеток зерна состоят из целлюлозы с преобладанием гемицеллюлоз, большая часть которой представлена арабиноксиланами с малым количеством β -глюканов и маннанов [49]. В организме домашней птицы не синтезируются ферменты, способные подвергать гидролизу названные полисахариды, поэтому часть внутриклеточного содержимого, остаётся физически недоступной для фитаз. Добавление в корм карбогидраз приводит к разрушению целостности клеточных стенок и 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 [50–52]. При включении в корм целлюлазы наблюдали повышение доступности фосфора на 30,4% и протеина – на 21,8% [53]. Под действием экзогенной протеазы высвобождение фосфора увеличивалось на 15% и протеина – на 14,5%. 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.

Размер молекул фитаз достаточно велик, чтобы они могли проникнуть в клетки через их естественные поры [54], и действовать на фитаты, находящиеся внутри клеток. Бактериальные фитазы по сравнению с грибными, в большинстве случаев, имеют меньший размер молекул [55]. Это даёт основание предполагать, что большая эффективность бактериальных фитаз может быть связана с размером их молекул, обеспечивающим им лучшую доступность к субстратам. Важным этапом для действия фитаз является растворение фитатов, что позволяет им диффундировать за пределы клеток и становиться доступными для действия фитаз.

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 [56, 57]. Установлено, что в содержимом желудка около 2/3 от общего количества фитатов присутствовало в жидкой фазе и 1/3 оставалась связанной с твёрдой фракцией корма, доступность которых для ферментативного гидролиза затруднена [31]. Неполное расщепления фитатов *in vivo* в среде естественными кормами обусловлено ограничением доступности ферментов к субстрату, но при этом остаётся торможение на уровне ИФ₄. Результаты, подтверждающие отмеченную закономерность, наблюдали и в других условиях экспериментов, используя *E. coli* фитазу [58, 59], фитазу *A. niger* и *Buttiauxella sp.* [46, 60, 61].

IV. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ФИТАЗ

В опубликованных статьях часто декларируется, что фитазы ЖКТ животных обладают слабой активностью, недостаточной для расщепления фитатов корма и усвоения из них фосфора [38, 62–65], однако это не совсем корректное мнение, которое повторяют из одного обзора в другой. Экспериментально установлено, что доля фитатов, перевариваемых эндогенными фитазами, обычно выше, чем дополнительно обеспечивают добавленные в корм экзогенные фитазы [66]. Так доступность фосфора пшеницы составляла 30,7%, при использовании кормовой фитазы она возросла на 16,1%, а из кукурузы – на 25,8% [67]. Аналогичные данные были получены в разное время другими исследователями [59, 68–70]. Экзогенные фитазы обычно обеспечивают прирост доступного фосфора не настолько много, по сравнению с влиянием эндогенных фитаз, чтобы считать их роль незначительной. При изучении механизма действия экзогенных фитаз необходимо учитывать активность фитаз, продуцируемых слизистой оболочкой кишечника и его микрофлорой [71]. Установлено, что переваримость фитатов зависит от методологии исследования и доз фитазы. Так, переваримость фитатов в подвздошной кишке под действием природных фитаз составила 50,6%, при включении в рацион 500 ед./кг фитазы *Buttiauxella* она повысилась до 63,6% и при 1000 ед./кг – до 68,3%. В то же время общая переваримость в ЖКТ соответственно составила: 38,3, 61,2 и 68,1%. Обращает внимание, что величины переваримости фитатов были очень близкими, тогда как исходная переваримость была существенно ниже, когда её определяли в балансовых опытах [72].

В эксперименте расщепление фитатов в зобе цыплят под влиянием естественных фитаз, содержащихся в сырье, составило 9% (табл. 4). Включение в корма трёх различных фитаз в дозе 500 ед./кг в несколько раз увеличило гидролиз фитатов в содержимом зоба [59]. В тонком кишечнике контрольной группы доля фитатов, расщеплённых под действием эндогенных фитаз, возросла до 59% и не намного больше под влиянием фитаз А и Е1; фитаза Е2 увеличила долю переваренных ИФ₆ до 88%. Более высокое расщепления фитатов в тонкой кишке под действием фитазы Е2 предположительно можно связать с её лучшей устойчивостью к протеазам кишечника [73]. Величины гидролиза ИФ₆ в ЖКТ всех групп до конца подвздошной кишки оказались близкими, и, практически, они сравнялись в слепых отростках. Из результатов эксперимента следует, что доля расщеплённых фитатов к концу ЖКТ мало зависела от включения в корм

Таблица 4. Остатки ИФ₆ в ЖКТ бройлеров в результате действия фитаза^а, %

Отделы желудочно-кишечного тракта	Подопытные группы ¹			
	ОР	Phy A	Phy E1	Phy E2
Зоб	91	36	69	56
12-ти перстная + тощая кишки	41	37	35	12
Подвздошная кишка	26	26	21	18
Слепые кишки	9	7	2	4

¹ – 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*.

^а – расчёт авторов настоящего обзора.

экзогенных фитаз. В слепых отростках расщепление фитатов составляло 14–19% – можно предполагать, что оно осуществлялось за счёт ферментов, продуцируемых микрофлорой. Величины остатков ИФ₆ в слепых кишках в некоторой степени совпадают с остатками в подвздошной кишке (табл. 2). Анализ динамики гидролиза ИФ₆ в настоящем исследовании вызывает ряд вопросов, требующих дальнейшего изучения. Учитывая, что доступность фосфора фитатов редко превышает 60%, не находит объяснения фактически одинаковая переваримость фитатов в тонком кишечнике цыплят, которая достигала 90% при участии экзогенных фитаз и без них. В данном случае не ставятся под сомнение результаты исследований, поскольку ранее также было установлено, что разложение фитатов в ЖКТ было почти полным, независимо от активности фитаз корма, но при этом использование фосфора различалось [31].

Активное участие фитаз ЖКТ в переваривании фитатов отмечено в экспериментах на свиньях, причём доля дополнительно высвобожденного фосфора под влиянием экзогенных фитаз существенно изменялась в зависимости от тестируемого сырья. Обращает внимание высокая доступность фосфора из кукурузного глютена, которая практически не изменялась под влиянием экзогенной фитазы [66]. По-видимому, это связано с технологией получения глютена, при которой сырьё предварительно обрабатывают в кислой среде для извлечения из него крахмала, при этом клетки разрываются и из них одновременно с высвобождением крахмала, фитаты становятся доступными действию эндогенных фитаз. В перспективе проблема

повышения доступности фосфора фитатов может быть решена путём создания фитазы с высокой скоростью расщепления $I(1,2,5,6)F_4$. Существование таких природных фитаз подтверждено при изучении расщепления ИФ в ЖКТ свиней, получавших рацион на основе ячменя и рапсового шрота [60]. Однако до настоящего времени о проведении целенаправленных работ в этом направлении с промышленными фитазами не известно.

V. АНТИПИТАТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФИТАТОВ

Распространено мнение, что фитаты, присутствующие в кормах, обладают антипитательным действием, однако это скорее профессиональный жаргон, чем научное определение. Фитаты кормов не содержат свободной ФК, поэтому они не обладают антипитательными свойствами. Последние начинают проявляться после попадания фитатов в кислую среду желудка, где они растворяются и переходят в ионизированное состояние с образованием иона ФК с высоким отрицательным зарядом. В этой среде происходит повторное образование фитатов, в результате связывания ФК с макро- и микроэлементами, белками и аминокислотами, снижающем их доступность для использования животными. Взаимодействие ионизированной ФК с питательными веществами освещено в научной литературе [36], однако динамика образования вторичных фитатов и действие на них фитаз *in vivo* не описаны. Изучение этого процесса сопряжено с техническими и методическими трудностями, что оставляет без внимания ряд вопросов, на которые отсутствуют ответы.

Наиболее понятным и доступным способом для преодоления антипитательного действия фитатов является их расщепление, которое уменьшает концентрацию свободной ионизированной ФК и её метаболитов в содержимом ЖКТ и последующее образование их комплексов с белками [71]. Фитаты кормов, недоступные для действия фитазы, находятся в связанном состоянии со структурами клеток, поэтому они не растворимы и соответственно не способны к ионизации, что исключает проявление их антипитательного действия.

Часто в популярной литературе антипитательное действие фитатов связывают с низкой доступностью фосфора, однако последнее свидетельствует только о низком использовании этого элемента и не связано с антипитательными свойствами. Отождествление низкой доступности фосфора с антипитательным действием является ошибочным [74]. Фитаты, попадая в зоб, не оказывают антипитательного действия, так как они слабо растворимы, кроме того в зобе процессы растворения

и переваривания других питательных веществ не выражены, поэтому отсутствует достаточное количество продуктов, которые могли бы вступать в реакцию с ИФ₆ или её метаболитами. Корм начинает перевариваться в желудке и одновременно в кислой среде ионизируются ИФ₆, поэтому в нём могут наиболее выражено протекать процессы, обуславливающие антипитательное действие ионов ФК.

Специалисты по питанию упускают из виду, что в тонком кишечнике протеин корма составляет около половины от его содержания в химусе. Другая половина представлена эндогенными белками, секретлируемыми в ЖКТ. В результате соотношение эндогенного белка и корма составляет примерно 1:1, а у свиней в кишечнике может достигать 2:1 [75–77]. В дальнейшем зарубежными учёными было подтверждено, что половина азота, присутствующего в тонкой кишке во время пищеварения, имеет эндогенное происхождение [78]. Поступление эндогенного протеина в ЖКТ является нормальной физиологической функцией. Этот процесс влияет на состав химуса и возможность его составных веществ связываться с ИФ₆, но образование вторичных фитатов остаётся не изученным.

Переваривание пищи в желудке у птиц сопровождается рефлюксом химуса из двенадцатиперстной кишки, который сопровождается повторным воздействием кислой среды на перевариваемые вещества, в том числе и на фитаты. Состав веществ, образующихся в процессе разбавления эндогенным протеином, изучен слабо. Без учёта влияния рефлюкса, предположения об изменении состава фитатов в ЖКТ на основании результатов исследований, проведенных *in vitro*, имеют ограниченный успех. При изучении эндогенных потерь изучают переваримость в подвздошной кишке, в которую эндогенная секреция протеина намного слабее, чем в двенадцатиперстную и тощую кишки, то есть получают результаты, не отражающие состояние пищеварения в целом кишечнике. Упущение из внимания указанных физиологических особенностей птицы, создаёт трудности при объяснении результатов экспериментов, которые могут приводить к ошибочным выводам.

О снижении использования протеина под влиянием фитатов известно с 70-х годов прошлого столетия, когда установили, что у фитатов корма, попавших в кислую среду желудка, катионы металлов заменяются Н⁺, и фитаты растворяются, превращаясь в анионы ФК (часть фосфатных групп, обладает отрицательным зарядом и в верхних отделах кишечника) [4, 19]. Взаимодействие между анионами ФК и аминокислотами белка, имеющими положительный заряд, приводит к образованию трудно растворимых соединений,

не доступных для повторного переваривания, то есть проявляется «антипитательное» действие. Интенсивность этого процесса зависит от природы белка, концентрации фитатов в корме и pH среды ЖКТ. Угнетающее действие фитата натрия на переваривание протеина было четко показано в эксперименте на цыплятах, которым после 48 часовой голодной выдержки скармливали 5 г казеина + 50 г воды, с добавлением фитата натрия и фитазы. Добавка 0,5 г фитата натрия снижала уровень метаболизируемого азота с 85% до 21% и при добавке 1 г фитата натрия – до 2%. Использование чистого протеина (казеина) и полностью доступного фитата натрия, который до потребления не был связан с протеином, четко продемонстрировало антипитательное действие ИФ₆. Включение в корм 1000 ед./кг фитазы повысило уровень метаболизируемого азота с 21% до 70% и с 2% до 54% соответственно на фоне 0,5 и 1,0 г фитата натрия [79]. Угнетение растворимости белка наблюдается при достижении критического отношения фитатов к белку около 1 : 20, то есть 10 г фитатов в расчете на 200 г протеина [80], что близко к таковому кормам, потребляемым в промышленных условиях [18]. Важно обратить внимание, что в опыте используемый корм не содержал преобразованных фитатов [79]. В проведенном исследовании снижение доступности протеина связано с образованием *de novo* бинарных комплексов «белок–ИФ₄₋₆» и, возможно, тройных комплексов: «ИФ₄₋₆–металл–белок» [18]. Растворимость и переваривание протеина желудочными протеазами изменяют его молекулярно-структурное состояние и заряд, что также влияет на их связывание с ИФ₆₋₄ [23]. Это подтверждено при изучении белковых фракций зерна бобовых культур, содержащих 17,7–19,9% основных аминокислот, растворимость которых выражено повышалась при расщеплении ИФ₆ [81].

Установлено ингибирование фитатами протеолитических ферментов, вырабатываемых животными, которое связывают с образованием в ЖКТ прочных бинарных комплексов, включающих ИФ₆ и фермент (белок). Их значительная часть, попадая в кишечник, где среда выше изоэлектрической точки белков корма, подвергается распаду, однако высвобожденный пепсин не активен в среде кишечника. Белки в этих условиях приобретают отрицательный заряд [82, 83]. Анионы ИФ₆, ИФ₅ и ИФ₄ 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 кальцием или цинком. В результате взаимодействия молекулы белка плотно располагаются вокруг относительно небольшого аниона ФК, имеющего высокий заряд, что приводит к образованию макро-

молекулярных скоплений или нерастворимых коацерватов [85]. Указанные превращения ведут к появлению новых фитатов, которые прежде отсутствовали в потреблённых кормах [7, 22–24]. Новообразованные фитаты, включающие протеин, имеют разную растворимость и пониженную доступность действию протеаз, что сопровождается неодинаковым проявлением антипитательного действия. Природные фитаты также различаются по растворимости в среде желудка и кишечника. В результате антипитательное действие будет зависеть от кормового ингредиента, содержащего ИФ. Специалисты, изучающие механизм действия ИФ и фитазы, отмечают, что выводы о роли белок-ФК комплексов в ЖКТ основаны в значительной мере на предположениях. Многочисленные эксперименты, посвящённые изучению взаимосвязи фитат – фитаза в ЖКТ до настоящего времени не позволили вскрыть механизм их взаимодействия. Это обусловлено сложностью физиологии пищеварения и химических взаимодействий в системе белок-ФК [86].

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 инозитолфосфатами. Одновременно наблюдали повышение гидролиза белка пепсином [58]. Подтверждена способность ИФ ингибировать расщепление пепсином казеина и бычьего сывороточного белка, которая наиболее выражена в присутствии IP₅ и IP₆, тогда как IP₁ и IP₂ не оказывали влияния [87]. *In vivo* наблюдали, что повышение расщепления фитатов корма не всегда сопровождается пропорциональным ростом доступности аминокислот [88].

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 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, снижая активность ряда ферментов, для которых минералы являются кофакторами.

VI. ЭКСТРАФОСФОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФИТАЗЫ

В многочисленных публикациях указывают, что экстрафосфорное действие фитазы проявляется путём повышения переваримости протеина и других питательных веществ [18, 52, 79, 88–96 и другие].

Эти выводы сделаны на основании оценки результатов балансовых опытов, при интерпретации результатов которых, ошибочно отождествляли физиологический процесс переваривания питательных веществ с процессом всасывания аминокислот и их использования [97]. Под экстрафосфорным действием фитаз понимают увеличение доступности других питательных веществ, кроме фосфора, то есть проявление эффекта, не связанного с функцией фитаз. Фитазы не могут непосредственно участвовать в переваримости протеина: они способствуют повышению доступности уже переваренных аминокислот, препятствуя их связыванию с фитатами в результате снижения концентрации фитатов за счёт их расщепления. Понятие «экстрафосфорное действие фитазы», не совсем удачное, так как фитаза обладает единственным действием и другие эффекты, хотя и связаны с фитазами, являются следствиями их действия на фитаты. Они являются опосредованными, возникающими в результате снижения концентрации реакционноактивных анионов ИФ₆₋₄, тогда как отщепление фосфатной группы от кольца инозитола является прямым эффектом [21]. В данном случае это уточнение не только вопрос стилистики. Чёткая формулировка проблемы позволяет яснее определять направления исследований. Понятие «экстрафосфорное действие», используемое в коммерческой среде для рекламных целей, является антиподом понятию «антипитательное действие»: первое проявляется в результате преодоления второго.

Обратим внимание на метод, связанный с изучением переваримости питательных веществ в подвздошной кишке, который получил распространение и признание. Выбор подвздошной кишки, вероятно, обусловлен её большей технической доступностью и удобством для изучения, особенно, если учесть малые размеры, а также и высокую метаболическую активность двенадцатиперстной и тощей кишок у цыплят и 2–4 недельных поросят. Переваривание в двенадцатиперстной и тощей кишках существенно отличается от такового в подвздошной кишке. В ней протекают заключительные процессы переваривания, которые начинаются в желудке и продолжаются в двенадцатиперстной и тощей кишках, поэтому переносить результаты, полученные при изучении переваривания в подвздошной кишке, на весь ЖКТ не верно.

Несмотря на появившиеся дополнительные аналитические возможности, интерес биохимиков к этой теме остаётся ограниченным. В подтверждение необходимости изучения биохимии пищеварения с учётом особенностей отдельных частей ЖКТ, сошлёмся на эксперимент, в котором описана доступность аминокислот корма в различных участках кишечника [98]. Телятам скармливали два типа

заменителя цельного молока: один, полностью приготовленный из молочных продуктов, а другой – с частичной заменой белков молока концентратом соевого протеина. Скармливание заменителя, содержащего соевый белок, вызвало снижение в подвздошной кишке концентрации переваримого цистина на 4,6%, лизина – на 4,1% и треонина – на 7,2%, по сравнению с заменителем цельного молока, приготовленного на основе молочного белка. В то же время в тощей кишке концентрация доступного цистина снизилась на 49,4%, лизина – на 19,0% и треонина – на 23,3%. Исследователи предполагают, что значительное снижение переваримости белка могло быть связано с поступлением фитатов в составе соевого концентрата, которые могли образовывать не перевариваемые тройные комплексы.

Количество исследований, посвящённых изучению переваримости в различных отделах кишечника, и, особенно фитатов, ограничено, хотя они играют важнейшую роль в оценке получаемых экспериментальных данных и понятии механизма действия фитаз. Вернёмся к таблице 4, в которой представлены результаты изменения концентрации фитатов в ЖКТ, показывающие, что максимальная переваримость фитатов корма происходила на участке двенадцатиперстная + тощая кишки и в несколько раз меньше в подвздошной кишке [59]. При изучении катаболизма ИФ₆ в ЖКТ (табл. 2) установили, что включение в корм 1500 и 3000 ед./кг фитазы, концентрация остатков ИФ₆ в химусе подвздошной кишки снижалась до 7–6% [41]. Исследования были проведены в последние годы и ещё не получили развития в качестве нового методического подхода.

Указывают, что успешность применения фитаз для повышения использования аминокислот корма не устойчива и остаётся спорной [3], хотя, по нашему мнению, она является не столько спорной, сколько обусловлена не изученностью причин, вызывающих различия между результатами экспериментов. Частично негативное действие фитатов связывают с повышенным выделением и потерями эндогенных белков [78]. Однако, этот фактор, вероятно, не является определяющим, так как в экспериментах установлено, что в присутствии фитазы повышалась как кажущаяся [89], так и истинная перевариваемость белка [90], то есть с учётом эндогенных потерь. Наблюдаемую изменчивость улучшения доступности аминокислот в присутствии фитаз определяет ряд факторов, которые не могут быть одинаковыми, не повторяются от опыта к опыту и редко учитываются. Они включают: 1 – различия в свойствах применяемых фитаз и их доз; 2 – свойства компонентов рациона и их соотношение; 3 – концентрацию неорганических источников фосфора кальция в корме; 4 – природу

фитатов и их содержание в корме; 5 – степень переваримости структурных полисахаридов корма; 6 – уровень переваримости протеина; 6 – аминокислотный состав протеина корма; 7 – технологию приготовления комбикормов; 8 – тип кормления (сухой или жидкий); 9 – возраст и породу животных; 10 – различия в методологии проведения исследований. Перечень немалый и не исчерпывающий. Создать одинаковые условия при проведении экспериментов с учётом перечисленных факторов и их вероятных сочетаний невозможно.

Обобщение результатов по изучению эффективности фитаз позволили 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 экспрессии ...» [55]. Можно согласиться с первой частью этого утверждения, однако не ясно: чем можно руководствоваться при разработке новых лучших фитаз, если не изучены многие стороны механизма их действия на уровне «фитат–фитаза». Создание более продуктивных штаммов или более активных фитаз, хотя и важный, но не единственный путь для решения проблемы, поскольку он легко решается увеличением доз кормовых фитаз. Проблема в том, что как указано выше [55], не располагая «научными знаниями о фитазах» нельзя сформулировать требования к «новым, лучшим» фитазам. К подобному заключению пришла другая группа исследователей, указав, ни одна из известных фитаз не может удовлетворить всем требованиям к свойствам идеальной кормовой добавки [30].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коммерческие препараты фитазы изначально создавали для повышения доступности фосфора, входящего в состав фитатов корма. В связи с высокой стоимостью первых препаратов была рекомендована минимальная добавка по активности фермента, обеспечивающая повышение роста молодняка свиней и птицы, которая составляла 500–600 ед/кг. О дополнительном действии, сопровождающем применение фитазы, вначале её применения не было известно, что исключало понятие «экстрафосфорное действие фитазы» и «супердозы» фитазы. Понятие «супердоза» не является корректным, так как критерием оптимальности дозы любого БАВ 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.

В отношении фитатов распространено мнение, что они снижают доступность питательных веществ корма для всасывания. Однако фитаты не способны проявлять антипитательного действия: последнее наблюдается после растворения фитатов, отщепления от них высококореакционного аниона ФК. Нерастворимые фитаты таким свойством не обладают, так как они не могут связывать питательные вещества. Фитазы непосредственно не снижают антипитательное действие фитатов: они их разрушают, то есть разлагают действующее вещество: ФК и её активные катаболиты. В связи с этим важно изучение процесса 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 корма достаточного количества экзогенных фитаз. Вторая – зависит от повышения переваримости корма в целом. В частных случаях она может быть преодолена включением в корма карбогидраз и протеаз, которые нарушают целостность оболочек клеток, препятствующих доступности гидролаз к питательным веществам цитоплазмы. В этом направлении проведено несколько десятков исследований, завершившихся различной эффективностью, и механизм получения положительных результатов, остаётся не изученным и знания остановились на уровне предположений.

Инициация отщепления первой группы под влиянием 3- или 6-фитаз приводит к образованию инозитолпентафосфатов, которые включают $I(1,2,4,5,6)F_5$ и $I(1,2,3,4,5)F_5$. Эти метаболиты связывают питательные вещества слабее по сравнению с IF_6 , но $I(1,2,4,5,6)F_5$ образует более прочные связи с белками по сравнению с $I(1,2,3,4,5)F_5$. Кроме того метаболит $I(1,2,4,5,6)F_5$ является предшественником $I(1,2,5,6)F_4$, который тормозит дальнейшие этапы расщепления ИФ. Это даёт повод отдавать предпочтение 6-фитазам.

Экстрафосфорный эффект фитаз, то есть находящийся за пределами фосфогидролазного действия, выражается в повышении доступности микро-, макроэлементов и аминокислот, крахмала. Фитазы не обладают протеолитическим или амилолитическим действием, поэтому распространённое в литературе мнение о повышении переваримости протеина и крахмала под влиянием фитаз не верно.

Анализ многочисленных публикаций показывает, что увеличение доступности аминокислот при включении в корм фитаз, не совпадает с составом перевариваемого протеина. Сомневаться в приводимых

экспериментальных данных нет оснований, однако реальный механизм повышения доступности аминокислот остаётся не выясненным. Результаты экспериментов позволяет сделать предположение о том, что повышение доступности аминокислот обусловлено распадом ФК. Избирательное связывание отдельных аминокислот может быть связано с динамикой переваривания протеина и физико-химическими свойствами отдельных аминокислот. Это может быть легко проверено с использованием модельных растворов аминокислот в присутствии фитата натрия (и низших фосфорных эфиров ИФ), однако подобных исследований до стоящего времени не проведено. Существующее мнение 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 подтверждает предположение о связывании питательных веществ после переваривания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kornegay, E.T. (2000) 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). Finnfed Marlborough Wiltshire UK, CABI Publ. 237–272.
2. Godoy, S., Chicco, C., Meschy F., Requena F. (2005) Phytic phosphorus and phytase activity of animal feed ingredients, *Interciencia*, **30**, 24–28.
3. Selle, P. H., Ravindran, V. (2007) Microbial phytase in poultry nutrition, *Animal Feed Science and Technology*, **135**, 1 – 41.
4. Costello, A.J.R., Glonek, T., and Myers, T.C. (1976) P-nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate, *Carbohydrate Resource*, **46**, 159–171.
5. Bohn, L., Meyer, A. S., Rasmussen, S. K. (2008) Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding, *Journal of Zhejiang University Science, B.*, **9**, 165–191.
6. Lönnnerdal, B. (2002) Phytic acid-trace element (Zn, Cu, Mn) interactions, *International Journal of Food Science & Technology*, **37**, 749–758
7. Champagne, E.T., Fisher, M.S., Hinojosa, O. (1990) NMR and ESR studies of interactions among divalent cations, phytic acid, and N-acetyl-amino acids, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **38**, 199–215.
8. Cheryan, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **13**, 297–335.

Вклад авторов. Авторы в равной степени участвовали в подготовке рукописи, пересмотре ее содержания и утверждении окончательной версии, представленной для публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

9. Torres, J., Dominguez, S., Cerda, M.F., Obal, G., Mederos, A., Irvine, R.F., Diaz, A., Kremer, C. (2005) Solution behaviour of myo-inositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentainagesium species under cytosolic/nuclear conditions, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **99**, 828–840.
10. Vohra, P., Gray, G.A., Kratzer, F.H. (1965) Phytic acid-metal complexes, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **120**, 447–449.
11. Bullock, J.I., Duffin, P.A., Nolan, K.B., Smith, T.K. (1995) Effect of phytate on the *in vitro* solubility of Al^{3+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} as a function of pH at 37° C, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **67**, 507–509.
12. Nolan, K.B., Duffin, P.A., Mcweeny, D.J. (1987) Effects of phytate on mineral bioavailability *in vitro* studies on Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} (also Cd^{2+}) solubilities in the presence of phytate, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **40**, 79–85.
13. Vasca, E., Materazzi, S., Caruso, T., Milano, O., Fontanella, C., Manfredi, C. (2002) Complex formation between phytic acid and divalent metal ions: A solution equilibria and solid state investigation, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **374**, 173–178.
14. Simpson, C.J., Wise, A. (1990) Binding of zinc and calcium to inositol phosphates (phytate) *in vitro*, *British Journal of Nutrition*, **64**, 225–232.
15. Brown, E.C., Heit, M.L., Ryan, D.E. (1961) Phytic acid – Analytical investigation, *Canadian Journal of Chemistry – Revue Canadienne de Chimie*, **39**, 1290–1297.
16. De Rham, O. D. and Jost, T. (1979) Phytate protein interactions in soybean extracts and low-phytate soy protein products, *Journal of Food Science*, **44**, 596–600.
17. Fretzdorff, B., Brummer, J.M., Röcken, W., Greiner, R., Konietzny, U., Jany, K.-D. (1995) Reduktion des Phytinsäure-Gehaltes bei der Herstellung von Backwaren und Getreidenährmitteln, *AID-Verbraucherdienst*, **40**, 12–20.
18. Selle, P.H., Ravindran, V., Caldwell, R.A., Bryden, W.L. (2000) Phytate and phytase: consequences for protein utilization, *Nutrition Research Reviews*, **13**, 255–278.
19. Liu, S., Chrystal, P., Moss, A., Selle, P. (2017). Negative impacts of phytate are subject to digestible lysine: starch ratios in poultry diets. 28th Annual Australian Poultry Science Symposium (APSS 2017), Camden NSW: The Poultry Research Foundation University of Sydney and The Worlds Poultry Science Association. P. 96–101.
20. Morales, G.A., Marquez, L., Hernández, A.J., Moyano, F.J. (2016) Phytase effects on protein and phosphorus bioavailability in fish diets. In: C.L. Walk et al. (ed.) Phytate destruction – consequences for precision animal nutrition, Wageningen Academic Publishers 2016. 129–165.
21. Dersjant-Li, Y., Hraby, M., Evans, C., Greiner, R. (2019) A critical review of methods used to determine phosphorus and digestible amino acid matrices when using phytase in poultry and pig diets, *Journal of Applied Animal Nutrition*, **7**, e2, 1–9.
22. Nissar, J., Ahad, T., Naik, H.R., Hussain, S.Z. (2017) A review phytic acid: As antinutrient or nutraceutical, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **6**, 1554–1560.
23. Anderson, P.A. (1985) Interactions between proteins and constituents that affect protein quality, In: Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds, (JW Finley and DT Hopkins, eds). St Paul, MN.

- American Association of Cereal Chemists, Inc. 31–45.
24. Oh, B.C., Choi, W.C., Park, S., Kim, Y.O., Oh, T.K. (2004) Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **63**, 362–372.
 25. Sandberg, A.S., Brune, M., Carlsson, N.G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthén, L. (1999) Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **70**, 240–246.
 26. Greiner, R., Konietzny, U. (1998) Endogenous phytate-degrading enzymes are responsible for phytate reduction while preparing beans (*Phaseolus vulgaris*), *Journal of Food Processing and Preservation*, **29**, 321–331.
 27. Greiner, R., Lim, B. L., Cheng, Ch., Carlsson, N.-G. (2007) Pathway of phytate dephosphorylation by β -proteolytic phytases of different origins, *Canadian Journal of Microbiology*, **53**, 488–495.
 28. Rao, D.E.C.S., Rao, K.V., Reddy, T.P., Reddy, V.D. (2009) Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview, *Critical Reviews in Biotechnology*, **29**, 182–198.
 29. Bohn, L., Josefsen, L., Meyer, A. S., Rasmussen, S. K. (2007) Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 7547–7552.
 30. Bedford, M.R., and Walk, C.L. (2016) Chapter 3. Reduction of phytate to tetrakisphosphate (IP₄) to trisphosphate (IP₃), or perhaps even lower, does not remove its antinutritive property, In: Phytate destruction – consequences for precision animal nutrition. Editors C.L. Walk, et al. Wageningen Academic Publishers, 45–52.
 31. Schlemmer, U., Jany, K. D., Berk, A., Schulz, E., Rechkemmer, G. (2001) Degradation of phytate in the gut of pigs – Pathway of gastro-intestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved, *Archives of Animal Nutrition*, **55**, 255–280.
 32. Wise, A., Gilburt, D. J. (1982) In vitro competition between calcium phytate and the soluble fraction of rat small intestine contents for cadmium, copper and zinc, *Toxicology Letters*, **11**, 49–54.
 33. Jany, K. D., Greiner, R., Schlemmer, U. (1999) Abbau von Phytinsäure und myo Inositol Phosphaten durch alkalische Phosphatasen aus dem Schweinedarm, *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, **8**, 99–107.
 34. Miyazawa, E., Yoshida, T. (1989) Activities of phytase and alkaline-phosphatase in the intestinal contents of germfree and conventionalized rats, *Nutrition Reports International*, **39**, 99–105.
 35. Akter, M., Iji, P.A., Graham, H. (2017) Increasing zinc levels in phytase-supplemented diets improves the performance and nutrient utilization of broiler chickens, *South African Journal of Animal Science*, **47**, 648–660.
 36. Балабан Н.П., Сулейманова А.Д., Шакиров Е.В., Шарипова М.Р. (2018). Гистидиновые кислые фитазы микроорганизмов, *Микробиология*, **87**, 635–648.
 37. Jorquera, M., Martinez, O., Varuyama, F., Marschner, P., Mora, M. (2008) Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria, *Microbes and Environments*, **23**, 182–191.

38. Gontia-Mishra, I., Tiwar, S. (2013). Molecular and comparative phylogenetic analysis of phytases from fungi with their prospective applications, *Food Technology and Biotechnology*, **51**, 313–326.
39. Singh, B., Satyanarayana, T. (2015) Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **99**, 646–660.
40. Blaabjerg, K., Jørgensen, H., Tauson, A.H., Poulsen, H. D. (2011) 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, *Journal of Animal Science*, **89**, 3153–3162.
41. Sommerfeld, V., Künzel, S., Schollenberger, M., Kühn, I., Rodehutschord, M. (2018) Influence of phytase or myo-inositol supplements on performance and phytate degradation products in the crop, ileum, and blood of broiler chickens, *Poultry Science*, **97**, 920–929.
42. Walk, C.L. Bedford, M.R. Olukosi, O.A. (2018). 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 Science*, **97**, 1155–1162.
43. Menezes-Blackburn, D., Gabler, S., Greiner, R. (2015) Performance of seven commercial phytases in an in vitro simulation of poultry digestive tract, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 6142–6149.
44. Beeson, L. A, Walk, C. L., Bedford, M. R, Olukosi, O. A. (2017) 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*, **96**, 2243–2253.
45. Qvirist, L., Carlsson, N.-G., Andlid, T. (2015) Assessing phytase activity—methods, definitions and pitfalls, *Journal of Biological Methods*, **2**, e16.
46. Li, W., Angel, R., Kim, S.-W. Brady, K., Yu, S. Plumstead, P.W. (2017) Impacts of dietary calcium, phytate, and phytase on inositol hexakisphosphate degradation and inositol phosphate release in different segments of digestive tract of broilers, *Poultry Science*, **96**, 3626–3637.
47. Perryman, K.R., Masey O'Neill, H.V., Bedford, M.R., Dozier, W.A. 3rd. (2017) 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 losses1, *Poultry Science*, **96**, 611–621.
48. 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. (2018) The uses of microbial phytase as feed additive in poultry nutrition: A review. *Annals Of Animal Science*, **18**, 639–658.
49. Stone B.A. (2006) Cell walls of cereal grains, *Cereal Foods World*, **51**, 62–65.
50. Zanella, I., Sakomura, N.K., Rosa, A.P., Figueiredo, A.N., Magon, L. (2004) Enzyme supplementation on digestibility of corn-soybean diets for broiler chicks, *Ars Veterinaria*, **20**, 144–150.
51. Leslie, M.A., Moran, E.T. Jr., Bedford, M.R. (2007) The effect of phytase and glucanase on the ileal digestible energy of corn and soybean meal fed to broilers, *Poultry Science*, **86**, 2350–2357.
52. Adeola, O, Cowieson, A.J. (2011) Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant

- animal production, *Journal of Animal Science*, **89**, 3189–3218.
53. Zyla, K., Ledoux, D. R., Garcia, A., Veum, T. L. (1995) An in vitro procedure for studying enzymic dephosphorylation of phytate in maize-soyabean feeds for turkey poults, *British Journal of Nutrition*, **74**, 3–17.
54. Yoon, S. J., Choi, Y. I., Min, H. K., Cho, K. K., Kim, J. W., Lee, S. C., Jung, Y. H. (1996) Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp.4, and enzymatic properties of phytase enzyme, *Enzyme and Microbial Technology*, **18**, 449–454.
55. Yao, M.-Z., Zhang, Y.-H., Lu, W.-L., Hu, M.-Q., Wang, W., Liang, A.-H. (2011) Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications, *Journal of Applied Microbiology*, **211**, 1–14.
56. Barrier-Guillot, B., Casado, P., Maupetit, P., Jondreville, C., Gatel, F., Larbier, M. (1996a) Wheat phosphorus availability. 1. In vitro study: factors affecting endogenous phytic activity and phytic phosphorus content, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **70**, 62–68.
57. Barrier-Guillot, B., Casado, P., Maupetit, P., Jondreville, C., Gatel, F., Larbier, M. (1996b) Wheat phosphorus availability. 2. In vivo study in broilers and pigs; relationship with endogenous phytase activity and phytic phosphorus content in wheat, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **70**, 69–74.
58. Yu, S., Cowieson, A., Gilbert, C., Plumstead, P., Dalgaard, S. (2012) Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin, *Journal of Animal Science*, **90**, 1824–1832.
59. Zeller, E., Schollenberger, M., Kühn, I., Rodehutschord, M. (2015). Hydrolysis of phytate and formation of inositol phosphate isomers without or with supplemented phytases in different segments of the digestive tract of broilers, *Journal of Nutritional Science*, **4**, e1. 1–12.
60. Skoglund, E., Näsi, M., Sandberg, A.-S. (1998) Phytate hydrolysis in pigs fed a barley-rape seed meal diet treated with *Aspergillus niger* phytase or steeped with whey, *Canadian Journal of Animal Science*, **78**, 175–180.
61. Pontoppidan, K., Glitsoe, V., Guggenbuhl, P., Quintana, A. P., Nunes, C. S., Pettersson, D., Sandberg, A.-S. (2012) In vitro and in vivo degradation of myo-inositol hexakisphosphate by a phytase from *Citrobacter braakii*, *Archives of animal nutrition*, **66**, 431–444.
62. Maenz, D.D., Engle-Schaan, C.M., Newkirk, R.W., Classen, H.L. (1999) 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, *Animal Feed Science and Technology*, **81**, 177–192.
63. Maenz, D.D. and Classen, H.L. (1998) Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken, *Poultry Science*, **77**, 557–563.
64. 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. (2018) The uses of microbial phytase as feed additive in poultry nutrition – A review, *Annals of Animal Science*, **18**, 639–658.
65. Труфанов О.В. (2011). Фитаза в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы. Киев: Поліграфік, 112 с.

66. She, Y., Li, D., Zhang, Sh. (2017) Methodological aspects of determining phosphorus digestibility in swine: *A review, Animal Nutrition*, **3**, 97–102.
67. Leske, K.L., Coon, C.N. (1999) 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 Science*, **78**, 1151–115.
68. Tamim, N.M., Angel, R., Christman, M. (2004) Influence of dietary calcium and phytase on phytate phosphorus hydrolysis in broiler chickens, *Poultry Science*, **83**, 1358–1367.
69. Bello, A., Dersjant-Li, Y., and Korver, D R. (2019). 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*, **98**, 5789–5800.
70. Ingelmann CJ, Witzig M, Möhring J, Schollenberger M, Kühn I, Rodehutsord M. (2019), Phytate degradation and phosphorus digestibility in broilers and turkeys fed different corn sources with or without added phytase, *Poultry Science*, **98**, 912–922.
71. Nys, Y., Frapin, D., Pointillart, P. (1996) 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, 213–240.
72. Dersjant-Li, Y, Dusel, G. (2019) 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, *Journal of Animal Science*, **97**:2524–2533.
73. Elkhail, K.A.I., Manner, K., Borriss, O.R., Simon, O. (2007) *In vitro* and *in vivo* characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens, *British Poultry Science*, **48**: 64–70.
74. Джоунс Г. (2014). Как выбрать наилучшую фитазу при составлении рациона, «Ценовик», № **10**, 102–103.
75. Разенков И.П. (1948). Новые данные по физиологии и патологии пищеварения, Акад. мед. наук СССР. Москва: тип. изд-ва Акад. мед. наук СССР, 464 с.
76. Синещеков А.Д. (1965). Биология питания сельскохозяйственных животных. Москва: «Колос». 399 с.
77. Алиев А.А. (2007). Достижения физиологии пищеварения сельскохозяйственных животных в XX веке, *Сельскохозяйственная биология*, № **2**, 12–23.
78. Cowieson, A.J., Bedford, M.R., Selle, P.H., Ravindan, V. (2009) Phytate and microbial phytase: implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability, *World's Poultry Science Journal*, **65**, 401–418.
79. Cowieson, A. J., Acamovic, T., Bedford, M. R. Phytic Acid and Phytase: Implications for Protein Utilization by Poultry, *Poultry Science*, **85**, 878–885.
80. Mothes, R., Schwenke, K. D., Zirwer, D., Gast, K. (1990) Rapeseed protein – polyanion interactions. Soluble complexes between the 2S protein fraction (napin) and phytic acid, *Die Nahrung*, **34**, 375–385.
81. Morales, G.A., Saenz de Rodrigañez, M.A., Marquez, L., Diaz, M., Moyano, F.J. (2013) Solubilisation of protein fractions induced by *Escherichia coli* phytase and its effects on *in vitro* fish digestion of plant proteins, *Animal Feed Science and Technology*, **181**, 54–64.

82. Kies, A.K., De Jonge, L.H., Kemme, P.A., Jongbloed, A.W. (2006) Interaction between protein, phytate, and microbial phytase *in vitro* studies, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**, 1753–1758.
83. Selle, P.H., Ravindran, V., Bryden, W.L., Scott, T. (2006) Influence of dietary phytate and exogenous phytase on amino acid digestibility in poultry: a review, *Journal of Poultry Science*, **43**, 89–103.
84. Riche, M., Trottier, N.L., Ku, P.K. and Garling, D.L., (2001) Apparent digestibility of crude protein and apparent availability of individual amino acids in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed phytase pretreated soybean meal diets, *Fish Physiology and Biochemistry*, **25**, 181–194.
85. Cosgrove, D.J. (1966) The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates, *Reviews of Pure and Applied Chemistry*, **16**, 209–224.
86. Selle, P. H., Cowieson, A. J., Cowieson, N. P., Ravindran, V. (2012) Protein–phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal, *Nutrition Research Reviews*, **25**, 1–17.
87. Крюков В.С., Глебова И.В., Антипов А.А., (2019) Оценка действия фитаз в пищеварительном тракте и использование препаратов фитазы в питании животных (обзор), *Проблемы биологии продуктивных животных*, **2**, 19–43.
88. Siegert, W., Zuber, T., Sommerfeld, V., Krieg, J., Feuerstein, D., Kurrle, U., Rodehutsord, M. (2019), Pre-cecal amino acid digestibility and phytate degradation in broiler chickens when using different oilseed meals, phytase and protease supplements in the feed, *Poultry Science*, **98**, 5700–5713.
89. Yi, Z., Kornegay, E.T., Denbow, D.M. (1996) Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poult fed corn–soybean diets, *Poultry Science*, **75**, 979–990.
90. Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Bryden, W. L. (1999) Influence of Microbial Phytase on Apparent Ileal Amino Acid Digestibility of Feedstuffs for Broilers, *Poultry Science*, **78**, 699–706.
91. Rutherford, S.M., Chung, T.K., Moughan, P.J. (2002) The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken, *British Poultry Science*, **43**, 598–606.
92. Rutherford, S.M., Chung, T.K., Thomas, D.V., Zou, M.L., Moughan, P.J. (2012) 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, *Poultry Science*, **91**: 1118–1127.
93. Pirgozliev, V., Bedford, M. R., Aca-movic, T., Mares, P., Allymehr, M. (2011) The effects of supplementary bacterial phytase on dietary energy and total tract amino acid digestibility when fed to young chickens, *British Poultry Science*, **52**, 245–254.
94. Cowieson, A., Ruckebusch, J. P., Sorbara, J.O.B., Wilson, J.W., Guggenbuhl, P., Tanadini, L., Roos, F. (2017) A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in pigs, *Animal feed science and technology*, **231**:138–149.
95. Moss, A., Chrystal, P., Dersjant-Li, Y., Liu, S., Selle, P. (2019). The ranked importance of dietary factors influencing the performance of broiler chickens offered phytase-supplemented diets by the Plackett-Burman screening design, *British Poultry Science*, **60**, 439–448.
96. Walk, C.L., Olukosi, O.A. (2019). 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 Science*, **98**, 3884–3893.
97. Крюков В. и Зиновьев С. (2015). Давайте применять правильно биологические понятия!, «Комбикорма», № **12**, 89–90.
98. Montagne, L., Toullec, R., Lalles, J.P. (2001) Intestinal digestion of dietary and endogenous proteins along the small intestine of calves fed soybean or potato, *Journal of Animal Science*, **79**:2719–2730.