

С. В. Зиновьев, В. С. Крюков, Х. М. Мутиева, И. В. Глебова, Н. И. Ярован

Антипитательное действие фитатов — экстрафосфорный эффект фитазы (обзор)

Аннотация.

Проведен аналитический обзор о доступности фосфора из фитатов, которые повышают включением в корм фитазы, при этом не только расщепляется фитиновая кислота, но и в результате снижения концентрации уменьшает её антипитательное действие.

Фосфор из растительных кормов не полностью доступен для животных, так как он входит в состав фитатов, расщепление которых в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) животных ограничено. Фитаты, попадая в кислую среду желудка, ионизируются и вступают в реакции с положительно заряженными минералами, белками, аминокислотами, создавая соединения недоступные для дальнейшего переваривания. Включение фитазы в комбикорма сопровождается экстра фосфорным действием, которое выражается в увеличении доступности аминокислот и энергии. Решение о целесообразности включения фитазы в корма принимают на основании производственных испытаний предлагаемых препаратов.

Исследования, выполненные авторами *in vitro*, подтверждают предположение о вступлении фитатов в химические взаимодействия с пептидами, а также аминокислотами, образующимися в процессах переваривания белка, превращая их в недоступные для всасывания соединения. Предлагаемое объяснение не влияет на результаты балансового опыта, но позволяет развивать изучение механизма с точки зрения взаимодействия переваренных аминокислот с фитатами. Исходя из этого, просматривается другой вывод: разрушение фитатов должно происходить в организме до начала переваривания и растворения белка. У птицы этим местом являются зоб и желудки, у свиней — желудок. Для гидролиза вновь образовавшихся фитатов (ФК-аминокислота) необходимы фитазы, которые активны в среде тонкого кишечника при pH 6–7. В результате связанные аминокислоты будут повторно высвобождены и доступны для всасывания. Разработка новых препаратов фитаз с учётом предлагаемого объяснения, позволит создать более эффективные кормовые препараты.

Ключевые слова: корма для животных, фитаза, антипитательное действие фитатов, экстра фосфорное действие фитазы.

Авторы:

Зиновьев Сергей Владимирович — кандидат сельскохозяйственных наук; e-mail: neollit_13@mail.ru; ВНИИПП — филиал ФНЦ ВНИТИП РАН, 141552, Россия, Московская область, Солнечногорский район, п/п Ржавки, строение 1;

Крюков Валерий Сергеевич — доктор биологических наук, профессор, e-mail: kryukov.v.s@mail.ru; ООО «Кормогран», 119331, Россия, г. Москва, Марии Ульяновой ул., д. 11, кв. 5;

Мутиева Хава Мадаевна — кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, e-mail: muti-eva01@mail.ru; ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А. А. Кадырова» Агротехнологический институт, 364049, г. Грозный, ул. Льва Яшина 31 а;

Глебова Илона Вячеславовна — доктор сельскохозяйственных наук, доцент, e-mail: snow1968@inbox.ru; ФГБОУ ВО «Курская государственная сельскохозяйственная академия имени И. И. Иванова», 305021, Россия, г. Курск, ул. Карла Маркса, 70;

Ярован Наталья Ивановна — доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой химии, e-mail: n.yarovan@yandex.ru; ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н. В. Парахина» 302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, д. 69.

Введение. Большая часть фосфора в составе растительных кормов приходится на фитаты, которые в желудочно-кишечном тракте животных слабо перевариваются. В семенах при их прорастании активируются находящиеся в них фитазы,

которые высвобождают фосфор в виде ионов ортофосфорной кислоты. У животных в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) фосфор из фитатов высвобождается ограниченно [1]. Активности фитаз желудочно-кишечного тракта недостаточно для

переваривания фитатов. Доступность фосфора из растительных кормов повышают путем добавления к ним кормовых препаратов фитазы [2]. В настоящее время препараты фитазы являются самыми распространенными кормовым ферментом в мировом животноводстве: фитазу включают почти в 90 % комбикормов для птиц и несколько меньше в комбикорма для свиней. Изучение влияния фитатов корма на пищеварение, позволило установить, что они не только содержат труднодоступный фосфор, но еще и тормозят использование других питательных веществ. Фитаты, растворяясь в кислой среде желудка, превращаются в анионы фитиновой кислоты (ФК), которые вступают во взаимодействие с катионами цинка, кальция, положительно заряженными белками и аминокислотами, образуя соединения, которые недоступны для переваривания ферментами животных [3]. Эти свойства связывают с антипитательным действием фитатов. Механизм антипитательного действия фитатов изучен слабо, хотя сам факт его существования подтвержден в сотнях работ [5]. Практически не изученным остается участие фитатов в регуляции пролиферации клеток [6]. Также в последние годы установлены новые метаболические эффекты фитатов [7].

Цель исследований — анализ изучения антипитательного действия фитатов — экстрафосфорный эффект фитазы.

Изучение и создание кормовых фитаз связано с низкой доступностью фосфора из растительного сырья, что вызывает необходимость включения в корма минеральных источников фосфора, ресурс которых в глобальном аспекте ограничен [8]. Увеличение содержания фосфора в рационах животных ведет к росту стоимости комбикормов, а также повышенному содержанию фосфора в навозе, что ведет к загрязнению фосфором окружающей среды, включая источники воды. В настоящем обзоре описано действие фитатов на пищеварение у животных и существующие в связи с этим проблемы.

Фитаты кормов. Понятие «Фитаты», включает ряд веществ, которые объединяет присутствие в них фитиновой кислоты (ФК). ФК является мио-инозитолгексакисфосфатом (ИФ₆). Под названием «фитин», часто понимают содержащиеся в семенах растений соединения ФК с калием, магнием и кальцием, и некоторыми микроэлементами, которые являются основными природными фитатами кормов [10, 11]. Независимо от концентрации, фитатов в зерне злаков, относительная доля фосфора, приходящегося на фитаты, находится в узком диапазоне, составляя 61–72% от общего фосфора; в продуктах переработки масличных культур этот диапазон шире [12].

Исходя из разной реакционной активности фосфатных групп ИФ₆ они могут вступать в реакции с разнообразными веществами, образуя множество химических соединений, которые до конца не изучены. Связь антипитательного действия ФК с низкой доступностью фосфора фитатов, не верно, так как это свидетельствует только об ограниченной доступности фосфора. Специалисты разделяют антипитательное действие фитатов и свойства, связанные с низкой доступностью из них фосфора [13].

Антипитательное действие фитатов. Фитаты попадая в кислую среду желудка, растворяются и вступают в реакции с положительно заряженными ионами, к которым относятся двухвалентные металлы, молекулы белка и положительно заряженные аминокислоты. Кроме того, ионы фитиновой кислоты при pH выше 5,5, то есть в кишечнике, могут образовывать комплексы: анион белка-катион металла-анион фитиновой кислоты. В результате образуются новые фитаты, перечень которых намного шире, чем фитатов, потребленных с кормом [14]. Предполагают, что в результате образования комплексов ФК с молекулами белка, последние плотно располагаются вокруг относительно небольшого и высоко заряженного аниона ФК, что приводит к образованию макромолекулярных конгломератов или нерастворимых коацерватов с экранированными ИФ₆ [15]. Связывание фитатами протеина и крахмала, сопровождающееся торможением их переваривания и использования [16]. Предполагаемое образование в ЖКТ бинарных и тройных комплексов, включающих ИФ₆ и белок может сопровождаться ингибированием протеолитических ферментов [17]. Подтверждение этому получено в опыте на бройлерах, в котором наблюдали снижение эффективности использования протеина корма при добавлении в корм фитата натрия [18].

После поступления корма в желудок, ИФ₆ остается в исходной форме, или диссоциирует и связывается с белками, образуя бинарные (белок-ИФ₆) или тройные (белок-минерал-ИФ₆) комплексы. Взаимодействие ИФ₆-белок через ионные связи между ИФ₆ и основными аминокислотными остатками при значениях pH ниже изоэлектрической точки белков приводит к образованию бинарных комплексов. Образование бинарных и тройных комплексов белок-ИФ₆ в желудочно-кишечном тракте животных является ключевым механизмом, посредством которого ИФ₆ угнетает перевариваемость белка и доступность аминокислот.

В опытах *invitro*, используя ИФ₆ и эфиры инозитола с ИФ₅ по ИФ₁ установили, что при снижении числа фосфатных групп растворимость

соевого белка активно возрастала. Одновременно наблюдали повышение гидролиза белка в присутствии пепсина. Еще раньше было установлено ингибирование расщепления казеина и сывороточного белка пепсином в присутствии фитатов, причем наибольшее угнетение проявляли ИФ₆ и ИФ₅, тогда как ИФ₁ и ИФ₂ не оказывали влияния. Кроме прямого действия, ИФ₆ угнетает переваривание белка и крахмала в результате торможения активности трипсина и α -амилазы.

Экспериментальные данные, подтверждающие снижение эффективности использования протеина и энергии кормов под действием фитатов не получили достаточного научного объяснения. До сих пор ошибочно считают, что фитаты угнетают переваримость протеина [19].

Молекулярный механизм действия фитазы.

Фитазы относятся к одному из классов фосфатаз: фосфогидролаз мио-инозитол-1,2,3,5-цис-4,6-гексаксидигидрогенфосфата — они подвергают гидролизу эфирную связь между мио-инозитолом и фосфатной группой. Фермент, после присоединения к ИФ₆ и отщепления первой фосфатной группы, остается связанным с исходной частью молекулы и затем отщепляет от ИФ₅ следующую фосфатную группу и так далее. Гидролиз приводит к образованию низших эфиров мио-инозитолфосфата и свободных фосфатных групп, в результате протекания последовательных реакций дефосфорилирования. Фитаты корма не влияют на активность фитазы, хотя связывают другие белки [20]. На первой стадии действия фитаз высвобождается ион ортофосфата и образуются стероизомеры ИФ₅.

Проявление максимальной активности зависит от pH среды. По этому признаку их относят к кислыми или щелочными. Широкой субстратной специфичностью к фитатам, не содержащим металлов, обладают кислые фосфатазы, в то время как щелочные проявляют субстратную специфичность по отношению к фитатам, связанным с металлами. Считают действие фитаз при расщеплении фитатов ограничивает первая реакция не-

зависимо от типа фитазы. Чем объясняется этот факт — не ясно: или инициацией образования фермент-субстратного комплекса или ограничением доступности фермента к фитатам корма.

В эксперименте на бройлерах, получавших корма, с включающие экзогенную 6-фитазу, наблюдали снижение ИФ₆ в зобе и тонком кишечнике [21].

Исследования показали, что содержание ИФ₆ в зобе и подвздошной кишке цыплят, не получавших фитазы снизилось одинаково — на 30%. Под действием экзогенной фитазы содержание ИФ₆ в подвздошной кишке снижалось большими темпами, чем в зобе, составляя 45; 11 и 9% соответственно испытываемым дозам (табл. 1)

Обращает внимание, что под влиянием эндогенных фитаз в подвздошной кишке контрольной группы наблюдалась наибольшая концентрация метаболита И(1,2,3,4,5)Ф₅, что дает основание предполагать о его активном образовании из ИФ₆ или дальнейшим слабым дефосфорилированием. В то же время сумма метаболитов, содержащих фосфатную группу в 6 положении инозитольного кольца, была ниже, что свидетельствует об активности эндогенных 3- и 5-фитаз. Включение в корм 500 ед./кг 6-фитазы не снизило концентрацию И(1,2,3,4,5)Ф₅ и даже повысило ее на 12,9%, тогда как дальнейшее увеличение добавки в корм 1500 ед./кг фитазы привело к отчетливому проявлению действия экзогенной 6-фитазы, что привело к снижению ее концентрации более чем в 4 раза. Увеличение дозы фитазы до 3000 ед./кг привело к дальнейшему слабому снижению концентрации ИФ(1,2,3,4,5)Ф₅. На этом основании можно предположить, что повышение активности экзогенной 6-фитазы в корме выше 1500 ед./кг слабо влияет на дефосфорилирование фитатов. Представляет интерес анализ изменения концентрации метаболитов ИФ₅ и ИФ₄ для понимания механизма дефосфорилирования. И(1,2,3,4,6)Ф₅ и И(1,2,4,5,6)Ф₅. Вначале обратим внимание на концентрацию И(1,2,3,4)Ф₄ и И(1,2,5,6)Ф₄. Если концентрация И(1,2,3,4)Ф₄ достоверно не изменилась при добавке в корм 500 ед./кг фитазы, то содержание

Таблица 1. Влияние фитазы и мио-инозитола на концентрацию метаболитов ИФ₆ в химусе тонкого кишечника бройлеров

Варианты	ИФР _{3x} ²	ИФ (1, 5, 6) Р ₃	ИФ (1, 2, 3, 4) Р ₄	ИФ (1, 2, 5, 6) Р ₄	ИФ (1, 2, 3, 4, 6) Р ₅	ИФ (1, 2, 3, 4, 5) Р ₅	ИФ (1, 2, 4, 5, 6) Р ₅	ИФР ₆
	мкмоль/г сухого вещества							
Контроль (К)	1.1 ^b	n.d. ³	1.0 ^{a,b}	2.2 ^d	0.7 ^a	3.3 ^b	1.4 ^a	30.0 ^a
Phy500	2.3 ^a	< н.о.у ⁴	0.9 ^b	5.2 ^a	0.2 ^b	3.7 ^{a,b}	1.1 ^b	13.4 ^b
Phy1500	2.7 ^a	н.д.	0.2 ^c	4.2 ^{a,b}	н.д.	0.8 ^c	0.3 ^c	3.3 ^c
Phy3000	2.5 ^a	н.д. п.	н.д.	3.8 ^{b,c}	н.д.	0.6 ^c	0.2 ^c	2.8 ^c

И(1,2,5,6)Ф₄ возросло в 2,4 раза по сравнению с контрольной группой. Увеличение активности экзогенной 6-фитазы в корме до 1500 ед./кг снизило концентрацию И(1,2,3,4)Ф₄ в химусе в 5 раз по сравнению с его содержанием в контрольной группе. В тоже время концентрация И(1,2,5,6)Ф₄ оставалась в 1,9 раза выше чем в контрольной группе и недостоверно снизилась по сравнению с таковой у цыплят, получавших корм с добавкой 500 ед./кг 6-фитазы. Возрастание содержания в корме экзогенной фитазы до 3000 ед./кг привело к исчезновению в химусе И(1,2,3,4)Ф₄, тогда как концентрация И(1,2,5,6)Ф₄ в химусе подвздошной кишки оставалась в 1,7 раза выше чем в контрольной группе. Эти результаты дают основание предполагать, что медленное дефосфорилирование ИФ₆ в цепи последовательных реакций ИФ₆→ИФ₁ является узким местом, тормозящим весь цикл дефосфорилирования ИФ₆. Предшественниками И(1,2,5,6)Ф₄ являются два метаболита: И(1,2,3,4,6)Ф₅ и И(1,2,4,5,6)Ф₅ концентрация которых в сумме во всех вариантах оставалась ниже, чем И(1,2,3,4,5)Ф₅, который был предшественником И(1,2,3,4)Ф₄ однако концентрация последнего при добавке в корм 500 ед./кг фитазы не изменилась и при дозе 1500 ед./кг снизилась в 5 раз. Таким образом, можно ожидать, что накопление в среде И(1,2,5,6)Ф₄ связано при пониженной скорости инициации дефосфорилирования ИФ₆ у шестого углеродного атома инозитола или ускоренным дефосфорилированием у 3 и 5 углеродных атомов инозитола. При отчетливом торможении дальнейшего дефосфорилирования И(1,2,5,6)Ф₄.

Выведенное предположение подкреплено при анализе результатов других исследователей. Результаты, полученные на основании другого методического подхода позволили изучить содержание суммы отдельных метаболитов в помете цыплят аналогичного возраста под влиянием таких же доз кормовых фитаз. Концентрацию метаболитов с одинаковым числом фосфатных групп

в помете можно рассматривать как суммарную, стожившуюся в результате их образования и распада (табл. 2).

Под влиянием наиболее часто рекомендуемой дозы фитазы живая масса цыплят в 3-х недельном возрасте повысилась на 4%; увеличение дозы фитазы до 1500 ед./кг вызвало дальнейший слабый прирост живой массы. Концентрация ИФ₆ в помете цыплят под действием рекомендуемой дозы фитазы снизилась на 48% и под влиянием «супер дозы» — на 78%. В помете контрольной группы концентрация ИФ₄ была ниже, чем ИФ₅, что могло быть связано с недостаточным образованием ИФ₅, при низкой активности эндогенных фитаз. При потреблении корма, содержавшего 500 ед./кг фитазы, концентрация ИФ₅ практически не изменилась, но отчетливо повысился уровень ИФ₄. В группе, получавшей корм, включающий 1500 ед./кг экзогенной фитазы, снизилось концентрация ИФ₆, однако при этом в 2,4 раза возросло содержание ИФ₄. Несомненно это обусловлено превращением ИФ₆ в ИФ₅, тем не менее его концентрация тоже снизилась, что свидетельствует об активации процесса превращения ИФ₅ в ИФ₄. Метаболизм ИФ₄, будучи узким местом в цепи его превращения в ИФ₃, привел к существенному росту концентрации ИФ₄.

Неполное переваривание фитатов может быть обусловлено: 1. Недостатком фермента по отношению к субстрату. 2. Ограничением доступности фермента к фитатам, содержащихся в кормах. Эти причины частично преодолеваются известными способами. С точки зрения регуляции молекулярного механизма цепи последовательных этапов дефосфорилирования ИФ₆, узким местом, тормозящим процесс, является низкая скорость дефосфорилирования ИФ₄, наблюдаемая даже при высоких дозах экзогенной фитазы.

Механизм действия фитазы в организме.

Максимальное проявление активности фитазы зависит от рН среды, в которой находится фермент. В таблице 3 приведены основные свой-

Таблица 2. Концентрация инозитолфосфатов в корме и помете 3-недельных бройлеров

Добавлено фитазы*, ед./кг	Живая масса в 3 недели, г/гол	Концентрация метаболитов ИФ**, г/кг				
		Корм				
		ИФ ₆	ИФ ₅	ИФ ₄	ИФ ₃	Инозитол
		11,56	0,558	Не обнаружено		
		Помёт				
Контроль (К)	840	39,5	4,70	3,04	0,24	0,37
К+ 500	874	20,7	4,76	4,93	0,18	0,80
К+ 1500	882	8,8	2,73	7,30	0,26	1,23

* Модифицированная 6-фитаза *QuantumBlue*; ** Сумма стереоизомеров.

ства наиболее распространенных в коммерческих препаратах странах ЕС.

Учитывая разные требования к кислотности среды и ее изменчивость на протяжении ЖКТ следует ожидать, что активность фитаз не будет одинаково проявляется в его разных отделах, что подтверждается в эксперименте при изучении активности фитаз продуцируемых *E. coli* и *P. Lycii* [22]. Оптимум активности обеих фитаз определенный *in vitro* находился в диапазоне pH 4–4,5. В корма опытных групп включили одинаковое по активности количество фитаз, однако активность фитазы *E. coli*, определенной стандартным методом на фоне комбикорма была ниже, тогда как фитазы *P. lycii* несколько выше заявленной (табл. 4). В химусе зоба, где не происходит активных процессов пищеварения, активность эндогенных фитаз по сравнению с исходной в корме возросла в 2,9 раза. В тоже время эта среда оказалась не благоприятной для добавленных фитаз и их активность снизилась по сравнению с исходной в корме в 2,5–5,2 раза.

Но при этом она была в несколько раз выше, чем в контрольной группе. В суммарном содержимом железистого и мышечного желудков проявление активности как эндогенных, так и добавленных фитаз было резко подавлено. Можно заметить, с что снижение активности фитазы *E. coli* было обратимым и в тощей кишке она резко возросла,

тогда как *P. lycii* продолжала оставаться на минимальном уровне. В условиях опыта более устойчивой к условиям среды ЖКТ и действию ферментов была фитаза *E. coli*. Причины проявления различной активности 6-фитаз авторы не приводят. Проявление разной активности фитаз в изученных отделах кишечника не подкрепляется количеством переваренных фитатов.

Принимая во внимание, снижение способности фитатов к проявлению антипитательных свойств по мере углубления их расщепления, решающее значение приобретает возрастание доли фитатов, расщепляемых в зобе, учитывая отсутствие в этом отделе активных процессов переваривания протеина и крахмала. Фитаты корма при pH зоба слаборастворимы, поэтому они не могут вступать во взаимодействие и связываться с другими веществами по этой же причине их расщепляют не все фитазы. В связи с уменьшением концентрации фитатов снижается возможность связывания ими белков, аминокислот, кальция или других минералов. Несмотря на достижения в изучении механизма переваримости фитатов, основанные на экспериментах *in vitro*, перенести эти результаты в условия *in vivo* не удастся, также, как и изложить механизм действия эндогенных и экзогенных фитаз в условиях ЖКТ.

В 70-х годах обнаружено снижение использования протеина под влиянием фитатов. Предпо-

Таблица 3. Свойства основных фитаз доступных на рынке ЕС

Продуцент	Тип фитазы	pH оптимум	Активность при pH 3*	Торговое название	Год выпуска
<i>A. niger</i>	3	2,5–5,5	64	Natuphos®	1990
<i>A. niger</i>	3	6.0	—	Allzyme® SSF	—
<i>A. niger</i>	3	2.5	—	Finase® P/L	—
<i>E. colli</i>	6	4.5	83	Phyzyme® XP	2003
<i>E. colli</i>	6	4.5	101	Quantum®	2007
<i>E. colli</i>	6	—	211	Quantum Blue®	2012
<i>E. colli</i>	6	3.4–5.0	56**	OptiPhos®	2006
<i>Peniophora lycii</i> *	6	4.0–4.5	—	Ronozyme®	2002
<i>Citrobacter braakii</i>	6	—	146	Ronozyme Hiphos®	2016
<i>Buttiauxella spp.</i>	6	3.5–4.5	129	Axtra® PHY	2013

* Активность при pH 3 выражена в % от активности при pH 5,5.

Таблица 4. Активность фитаз в химусе в расчете на 1 кг потреблённого корма

Место отбора образца	ОР (1,0% Ca;0,39; % общего P)	ОР + 1000 FTU/кг фитазы <i>E. coli</i>	ОР + 1000 FTU/кг фитазы <i>P. lycii</i>
Корм	14	825	1152
Зоб	41	328	218
Желудок	10	119	25
Тощая кишка	24	707	36
Подвздошная кишка	49	328	22

лагают, что фитаты способны растворяться в условиях кислой среды желудка — это обусловлено замещением ионов металлов, связанных с ФК ионами H^+ , концентрация которых оказывается достаточной при низких значениях pH. Образующиеся протонированные фитат-ионы содержат фосфатные группы, сохраняющие отрицательный заряд как в желудке при pH от 2 до 3 [23], так и в верхних отделах кишечника. В химусе взаимодействие аминокислот белка с анионами фитата приводит к образованию не доступных для всасывания трудно растворимых соединений. Интенсивность процесса зависит от природы белка и концентрации фитатов в корме [24]. Потребление корма с содержанием 0,25–0,35% фитатов ведет к снижению растворимости протеина и всасывания переваренных аминокислот. Предполагают, что фитаты связывают глицин, серин, треонин, пролин и в ряде случаев — гистидин [25]. Обобщение результатов, опубликованных в десятках статей показало, что включение в рацион фитазы приводило к приросту всосавшихся аминокислот: от 0 до 7%. В исследованиях отмечается слабое изменение доступности глутаминовой кислоты, аргинина, метионина, однако, повышение доступности серина, цистеина, пролина, треонина, глицина проявлялось достаточно значительно [26].

При добавлении в корм фитазы сравнительная оценка переваримости протеина пшеницы и кукурузы у бройлеров продемонстрировала рост этого показателя по 9 аминокислотам с 80% до 93,4%. Отмечался значительный прирост по лизину — 17,6%, треонину — 16,9 %, изолейцину — 15,2% и гистидину — 15%; ниже средней величины увеличивался фенилаланин и лейцин. Переваримость протеина кукурузы составила 87%, но средний прирост по анализируемым аминокислотам составил всего 3,9%. Наибольшее увеличение переваримости протеина кукурузы установлено по треонину — 7,3% и гистидину — 6,0% [27]. Увеличение доли доступных аминокислот в двух последних исследованиях не совпало по направленности изменений, — авторы не объяснили причин наблюдаемых различий. В этих случаях изменение концентрации доступных аминокислот не отражало состава протеина корма.

Этими же авторами установлено сохранение общей переваримости протеина бройлерами на уровне 85,6% в исследованиях на фоне рациона с пониженным уровнем фосфора, но в присутствии фитазы. Однако в условиях данного опыта доступность аминокислот возрастала: треонина на 12,4, тирозина на 6,7, изолейцина на 6,5, гистидина на 3,1%, доступность цистеина при этом снизилась на 2,8% [27]. Таким образом, в случае ин-

гибирующего влияния фитатов на протеазы ЖКТ, динамика изменения концентрации аминокислот должна была бы быть пропорциональна их содержанию в протеине. Переваримость протеина могла снижаться в результате связывания фитат-ионами целых молекул белков корма, и это приводило бы к пропорциональному снижению концентрации всех аминокислот, однако приводимые различными авторами данные этого не подтверждают. Необходимо подчеркнуть, что в присутствии фитаз повышение доступности аминокислот отмечается при расщеплении не менее 30–40% фитатов [25], другими словами, оценивать следует количество расщепленных фитатов, а не активность фитазы и концентрацию фитатов в корме. К аналогичному заключению можно прийти анализируя результаты наблюдений на цыплятах, которым скармливали корм, не содержащий фитатов: в нем единственным источником белка был казеин. Включение в корм фитата натрия, снижало переваримость казеина с 85 до 2% и сухих веществ — до 37%. Уменьшение количества, добавленного фитата в 2 раза привело к снижению угнетения переваримости казеина и сухих веществ. Исследователи считают, что аналогичное по направленности действие фитатов происходит у птиц, которых кормят обычными рационами [25].

Механизм действия фитатов, проявляющийся в избирательном угнетении доступности отдельных аминокислот не связан с перевариванием протеина: возникающее снижение доступности аминокислот, образующихся при расщеплении белков, обусловлено химическими особенностями самих аминокислот, способных вступать во взаимодействие с фитат-ионами, а также значениями pH среды ЖКТ, где протекают данные реакции. Связывание аминокислот анионами фитиновой кислоты и, возможно, полипептидов зависит от их заряда, который может меняться в зависимости от pH среды, то есть отдела ЖКТ. Связывание питательных веществ и в результате снижение их доступности обуславливает антипитательное действие не фитатов, а высвобождающимся из них анионами фитиновой кислоты. Антиподом антипитательному действию является повышение доступности протеина и крахмала в присутствии фитазы, что относят к экстра фосфорному действию. При расщеплении фитиновой кислоты образуются свободные эфиры инозитолфосфата с меньшим содержанием фосфатных групп, что ведет к снижению их отрицательного заряда и в результате к потере способности блокировать переваривание белков и всасывания аминокислот и минералов. Таким образом феномен, названный «экстра фосфорным действием фитазы» не связан с ее прямым действием, а обусловлен снижением содержания

реакционно-активных анионов ФК в химусе. Повышенные дозы увеличивают использование протеина и энергии корма, но при этом в первую очередь повышается переваримость фитатов, которые в результате исчезают и с ними пропадает их антипитательное действие. Таким образом, происходит не «экстра» фосфорное, а одновременное повышение доступности фосфора и других питательных веществ. Фитаты недоступные для действия фитазы не обладают антипитательным действием, поскольку они связаны с другими веществами и не могут проявлять реакционную способность.

В связи с высокой стоимостью первых препаратов была рекомендована минимальная по активности добавка фермента, обеспечивающая повышение роста молодняка свиней и птицы, которая составляла 500–600 ед./кг. О дополнительном действии, сопровождающем применение фитазы, вначале ее применения не было известно, что исключало понятие «экстрафосфорное действие фитазы» фитазы. Понятие «супердоза» является не корректным, так как критерием оптимальности дозы любого биологически активного вещества, том числе кормового фермента, является достижение максимальной величины его действия. Если ранее рекомендованная доза не обеспечивала максимальной продуктивности, то ее нельзя называть оптимальной. Понятие «супердоза» в биологическом плане несостоятельно и применимо лишь в коммерческой среде. С появлением новых и более дешевых фитаз понятие «оптимальной» дозы стало размываться. Тем не менее, практики сравнивали рекомендуемые дозы новых фитаз, с ранее установленной «оптимальной» дозой «Натуфоса». Подобное сравнение носит эмоциональный характер и научно не обосновано, потому что созданные впоследствии фитазы отличаются от первой как по механизму действия, так и по своим свойствам (образуемыми стереоизомерами, величиной рН необходимой для проявления максимальной активности, устойчивость к протеазам животных и др.).

Определение активности фитаз. Фитаза является единственным ферментом, который изначально создавался для кормления животных и только для ее определения активности разработан международный стандарт, который утвержден в Европейском Союзе: ISO 30024:2009 (en). В качестве субстрата используют фитат натрия, который в кормах практически не содержится. Специалисты обращают внимание, что характеризующие ферментные препараты, единицы активности, невозможно применять при сравнении разных продуктов, они предусмотрены, в основном, для целей маркировки [28]. Активность отражает способность

фермента производить определенное действие в конкретных стандартных условиях метода анализа. Следует отметить, что активность, установленная при анализе стандартным методом, не совпадает с действием, проявляемым в нативных условиях ЖКТ, а, следовательно, не является надежным способом оценки сравнительной эффективности кормовых фитаз [28]. Условия действия ферментов в зобе, желудке, и даже различных отделах кишечника, характерны для конкретного места и субстраты попадают в каждый последующий отдел после воздействия на них ферментов в предыдущих отделах. В каждом отделе ЖКТ выделяются специфические ферменты, адаптированные для действия в конкретном отделе, секреция которых количественно изменяется в ответ на свойства присутствующих в определенном месте субстратов. Любые экзогенные ферменты обладают определенными заданными свойствами, количество которых в ЖКТ не регулируется биологическими механизмами. В связи с этим, каждая включенная в корм фитаза, будет проявлять оптимальную активность локально, тогда, как фитаты присутствуют на протяжении всего ЖКТ и к тому же их природа меняется: в начале присутствуют фитаты кормов, а начиная с желудка и далее к ним добавляются новые фитаты, которые образуются в результате взаимодействия анионов ФК с положительно заряженными ионами металлов, белками и крахмалом. Изменение субстратного состава повлечет за собой изменение активности. Исходя из выше изложенного, невозможно создать фитазу, как или другой экзогенный фермент, который будет полностью переводить субстраты в доступную для всасывания форму.

Потенциально фитаты могут перевариваться на 91–98%, однако в исследованиях на животных под влиянием фитаз доступность фосфора повышается на 16–25%, 20–50%, при этом значительная часть фосфора остается в составе фитатов и недоступна для организма. В другом обзоре указано, что опубликовано сотни сообщений о положительном действии фитазы на доступность фосфора и аминокислот, однако опубликованные результаты довольно неустойчивы.

При разработке рецептов комбикормов для учета действия ферментных препаратов, используют их матричные значения. Встречается два способа представления матричных величин — «по составу» и реже — «по влиянию». Первый способ более легкий в применении для разработчика рецептов, потому что предусматривает изменение питательности всего рациона. Второй способ требует расчета действия фермента отдельно на каждый вид сырья и отражает величину повышения

доступности питательных веществ корма, которая выражается в процентах. В инструкциях по применению ферментов, утвержденных «Россельхознадзором», отсутствует информация о матричных значениях ферментов, так как разработчики, в отличие от продавцов, не могут указать их фиксированные величины, поэтому значения матриц являются не официальными и используются для рекламных целей. Выбирая фитазу, следует отдавать предпочтение препаратам с широким диапазоном pH, в котором она проявляет активность. Необходимо получить подтверждения сохранения активности фитазы после действия на нее протеаз желудка и кишечника. Ферменты должны обладать термостабильностью и выдерживать режим гранулирования корма. Обещания поставщика без подтверждения результатов протоколами испытаний не следует принимать во внимание. Количество фосфора, добавляемого в корм за счет минеральных источников не должно превышать 0,25%, так как при дальнейшем его повышении эффективность действия фитазы теряется. При соблюдении перечисленных требований, фитазы всегда проявляют положительное действие. Реальную эффективность действия фермента можно определить только после предварительных испытаний препарата в конкретных условиях, на основании которых принимают решение о его приобретении. Отсутствие ожидаемого действия фермента, не всегда связано с его низким качеством, — возможно, не созданы условия для его действия.

Исследователи приходят к выводу, что многие аспекты фундаментальной информации о превращении фитатов в ЖКТ и механизме действия фитазы отсутствует, которые необходимо сформировать и интегрировать для более полного понимания этого предмета. В практическом плане разработка фитаз с улучшенными характеристиками является важной областью, которую разрабатывают применяя методы генной и белковой инженерии, однако ни одна из известных фитаз не может удовлетворить требованиям идеальной кормовой добавки. О невозможности объединения необходимых свойств в какой-либо одной фитазе указывают и другие исследователи [29]. На этом основании следует считать вполне рациональными

ми предложения о создании комплексных кормовых препаратов фитаз, включающих индивидуальные фитазы, проявляющие взаимодополняющее действие [30]. Считают, что при этом наибольшее внимание следует уделять раннему гидролизу фитатов в верхних отделах ЖКТ.

Заключение. Выявление экстрафосфорного эффекта фитазы не является неожиданным, поскольку он является антиподом антипитательного действия фитатов. Многие исследователи подтверждают, что использование фитаз в рационе способствует повышению доступности аминокислот, минералов, а также энергии корма. Это вытекает из результатов балансовых опытов, которые рассчитываются по разнице между потребленным и выделенным веществом. Фитаза не обладает протеолитическим действием, поэтому вывод о повышении переваримости протеина под ее действием не верен. Предполагаемое повышение переваримости протеина должно сопровождаться приростом доступных аминокислот, который отражал бы состав общего протеина, однако опубликованные работы этого не подтверждают.

Исследования, выполненные авторами *invitro*, подтверждают предположение о вступлении фитатов в химические взаимодействия с пептидами, а также аминокислотами, образующимися в процессах переваривания белка, превращая их в недоступные для всасывания соединения. Предлагаемое объяснение не влияет на результаты балансового опыта, но позволяет развивать изучение механизма с точки зрения взаимодействия переваренных аминокислот с фитатами. Исходя из этого, просматривается другой вывод: разрушение фитатов должно происходить в организме до начала переваривания и растворения белка. У птицы этим местом являются зоб и желудки, у свиней — желудок. Для гидролиза вновь образовавшихся фитатов (ФК-аминокислота) необходимы фитазы, которые активны в среде тонкого кишечника при pH 6–7. В результате связанные аминокислоты будут повторно высвобождены и доступны для всасывания.

Разработка новых препаратов фитаз с учетом предлагаемого объяснения, позволит создать более эффективные кормовые препараты.

Литература

1. Lowe J. T. Cereals and rickets. IX. The availability of phytin-P to the chick / J. T. Lowe, H. Steenbock, C. H. Keiger // Poult. Sci. — 1939. — Vol. 18. — P. 40–44.
2. Warden W. K. Preliminary investigations concerning utilization of phytin phosphorus by the chick / W. K. Warden, P. J. Schaible // Poult. Sci. — 1962. — Vol. — P. 41.
3. Крюков В. Матрицы ферментов или о чём умалчивают поставщики / В. Крюков, И. Глебова, С. Зиновьев // Комбикорма. — 2019а. — № 6. — С. 57.
4. Costello A. J. R. ³¹P-nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate / Costello A. J. R., T. Glonek, T. C. Myers // Carbohydrate Resource. — 1976. — V. 46. — P. 159–171.

5. Крюков В.С. Оценка действия фитаз в пищеварительном тракте и использование препаратов фитазы в питании животных / В. С. Крюков, И. В. Глебова, А. А. Антипов // Проблемы биологии продуктивных животных. — 2019. — № 2. — С. 5–25.
6. Brailoiu E. Inositol derivatives modulate spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction / E. Brailoiu, M. D. Miyamoto, N. J. Dun Neuropharmacology. — 2003. — Vol. 45. — P. 691–700.
7. Zhang Z. Inositol hexaphosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with suppression of colon carcinogenesis in rats / Z. Zhang, Y. Song, X. L. Wang // World J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 11. — P. 5044–5046.
8. Cordell D. The story of phosphorus: global food security and food for thought / D. Cordell, J.-O. Drangert, S. White // Global Envir Change. — 2009. — Vol. 19. — P. 292–305.
9. Джоунс Г. Как выбрать наилучшую фитазу при составлении рациона / Г. Джоунс // «Ценовик». — 2014. — № 10. — С. 102–103.
10. Редкозубов О. Фитаза. Что изменилось за последние 15 лет / О. Редкозубов // Ж. Комбикорма. — 2014. — № 12. — С. 71–74.
11. Труфанов О. В. Фитаза в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы. Киев: ПолиграфИнко, 2011. 112 с.
12. Kornegay E. T. 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). Farnham, UK, CABI Publ., 2000. P. 237–272.
13. Abdel-Hack M. E. The uses of microbial phytase as feed additive in poultry nutrition — A review / M. E. Abdel-Hack, M. Alagawany, M. Arif, M. Emam, M. Saeed, M. A. Arain, F. A. Siyal, A. Patra, S. S. Elnesr, R. U. Khan // Ann. Anim. Sci. — 2018. — Vol. 18. — P. 639–658.
14. Anderson P. A. Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. In: Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds. St Paul, MN. American Association of Cereal Chemists, Inc. 1985. P. 31–45.
15. Cosgrove D. J. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates / D. J. Cosgrove // Reviews of Pure and Applied Chemistry. — 1966. — Vol. 16. — P. 209–224.
16. Nouredдини H. Degradation of phytase in Distillers' grains and gluten feed by *Aspergillus niger* phytase / H. Nouredдини, J. Dang Applied Biochemistry and Biotechnology. — 2008. — Vol. 159. — P. 11–23.
17. Kies A. K. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase in vitro studies / A. K. Kies, L. H. De Jonge, P. A. Kemme, A. W. Jongbloed // Journal of Agriculture and Food Chemistry. — 2006. — № 54. — P. 1753–1758.
18. Cowieson A. J. Phytic Acid and Phytase: Implications for Protein Utilization by Poultry / A. J. Cowieson, T. Acamovic, M. R. Bedford // Poultry Science. — 2006. — Vol. 85. — P. 878–885.
19. Cowieson A. J. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in broiler / A. J. Cowieson, J. P. Ruckebusch, J. O. B. Sorbara, J. W. Wilson, P. Guggenbuhl, F. F. Roos // Animal Feed Science and Technology. — 2017. — Vol. 225. — P. 182–194.
20. Yu S. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin / S. Yu, A. Cowieson, C. Gilbert, P. Plumstead, S. Dalsgaard J. Anim. Sci. — 2012. — Vol. 90. — P. 1824–1832.
21. V. Sommerfeld, S. Kьnzell, M. Schollenberger, I. Kьhn, Rodehutschord M. Influence of phytase or myo-inositol supplements on performance and phytate degradation products in the crop, ileum, and blood of broiler chickens. Poultry Science. — 2018. — Vol. 97. — P. 920–929.
22. Onyango E. M. Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks / E. M. Onyango, M. R. Bedford, O. Adeola // Poultry Sci. — 2005. — № 84. — P. 248–255.
23. Champagne E. T. NMR and ESR studies of interactions among divalent cations, phytic acid, and N-acetyl-amino acids / E. T. Champagne, M. S. Fisher, O. Hinojosa // Journal of Inorganic Biochemistry. — 1990. — Vol. 38. — P. 199–215.
24. Mothes R. Rapeseed protein — polyanion interactions. Soluble complexes between the 2S protein fraction (napin) and phytic acid / R. Mothes, K. D. Schwenke, D. Zirwer, K. Gast // Die Nahrung. — 1990. — № 34. — P. 375–385.
25. Cowieson A. J. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens / A. J. Cowieson, V. Ravindran // British Journal of Nutrition. — 2007. — Vol. 98. — P. 745–752.
26. Adeola O. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production / O. Adeola, A. J. Cowieson // J. Anim. Sci. — 2011. — Vol. 89. — P. 3189–3218.
27. Rutherford S. M. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in broiler chickens / S. M. Rutherford, T. K. Chung, P. J. Moughan // Br. Poult. Sci. — 2002. — № 44. — P. 598–606.
28. Vasquez M.V. and Glitsoe V. Phytase Unit Myth! 2012. https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/2012_Phytase_unit_myths.pdf

29. Gontia-Mishra I. Molecular Characterization and Comparative Phylogenetic Analysis of Phytases from Fungi with Their Prospective Applications. Food Technol / I. Gontia-Mishra, S. Tiwars // Biotechnol. — 2013. — Vol. 51. — P. 313–326.
30. Elkhail K. A. I. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens / K. A. I. Elkhail, K. Manner, O. R. Borriss, O. Simon // British Poultry Science. — 2007. — Vol. 48. — P. 64–70.

Zinoviev S., Kryukov V., Mutieva H., Glebova I., Yarovan N.

The anti-nutritional effect of phytates — the extraphosphorus effect of phytase (review)

Abstract.

An analytical review was conducted on the availability of phosphorus from phytates, which increase the inclusion of phytase in the feed, while not only phytic acid is broken down, but also as a result of a decrease in concentration reduces its anti-nutritional effect.

Phosphorus from plant feeds is not fully available to animals, as it is part of phytates, the cleavage of which in the gastrointestinal tract (gastrointestinal tract) of animals is limited. Phytates, getting into the acidic environment of the stomach, ionize and react with positively charged minerals, proteins, amino acids, creating compounds inaccessible for further digestion. The inclusion of phytase in compound feed is accompanied by an extra phosphoric effect, which is expressed in an increase in the availability of amino acids and energy. The decision on the feasibility of including phytase in feed is made on the basis of production tests of the proposed drugs.

The studies carried out by the authors of invitro confirm the assumption that phytates enter into chemical interactions with peptides, as well as amino acids formed in the processes of protein digestion, turning them into compounds inaccessible to absorption. The proposed explanation does not affect the results of the balance experiment, but allows us to develop the study of the mechanism in terms of the interaction of digested amino acids with phytates. Based on this, another conclusion can be seen: the destruction of phytates should occur in the body before the digestion and dissolution of protein. In birds, this place is the goiter and stomachs, in pigs — the stomach. The hydrolysis of newly formed phytates (FC-amino acid) requires phytases that are active in the environment of the small intestine at pH 6–7. As a result, the bound amino acids will be re-released and available for absorption. The development of new phytase preparations, taking into account the proposed explanation, will make it possible to create more effective feed preparations.

Keywords: animal feed, phytase, anti-nutritional effect of phytates, extra phosphoric effect of phytase.

Authors:

Zinoviev S. — PhD (Agr. Sci.), e-mail: neollit_13@mail.ru; VNIIPP — branch of FNC VNITIP RAS, 141552, Russia, Moscow region, Solnechnogorsky district, r/p Rzhavki, building 1;

Kryukov V. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), Professor, e-mail: kryukov.v.s@mail.ru; LLC «Kormogran», 119331, Russia, Moscow, Maria Ulyanova str., 11, sq 5;

Mutieva H. — PhD (Agr. Sci.), Associate Professor, e-mail: muti-eva01@mail.ru; A. A. Kadyrov Chechen State University Agrotechnological Institute, 31a Lev Yashin str., Grozny, 364049;

Glebova I. — Dr. Habil. (Agr. Sci.), Associate Professor, e-mail: snow1968@inbox.ru; Kursk State Agricultural Academy named after I.I. Ivanov, Kursk, Karl Marx str., 70, 305021, Russia;

Yarovan N. — Dr. Habil. (Biol. Sci.), Professor, Head of the Department of Chemistry, e-mail: n.yarovan@yan-dex.ru; Oryol State Agrarian University named after N. V. Parakhin, Orel, 69 Generala Rodina str., 302019.

References

1. Lowe J. T. Cereals and rickets. IX. The availability of phytin-P to the chick / J. T. Lowe, H. Steenbock, C. H. Keiger // Poult. Sci. — 1939. — Vol. 18. — P. 40–44.
2. Warden W. K. Preliminary investigations concerning utilization of phytin phosphorus by the chick / W. K. Warden, P. J. Schaible // Poult. Sci. — 1962. — Vol. — P. 41.
3. V. Kryukov, I. Glebova, S. Zinoviev / The Matrix of Enzymes or what is silent suppliers // Compound Feed. — 2019a. — № 6. — p. 57.
4. Costello A. J. R. ³¹P-nuclear magnetic resonance-pH titrations of myo-inositol hexaphosphate / Costello A. J. R., T. Glonek, T. C. Myers // Carbohydrate Resource. — 1976. — V. 46. — P. 159–171.

5. Kryukov V. S. Evaluation of fitase action in the digestive tract and the use of phytase preparations in animal nutrition / V. S. Kryukov, I. V. Glebova, A. A. Antipov // *Problems of biology of productive animals*. — 2019. — № 2. — P. 5–25.
6. Brailoiu E. Inositol derivatives modulate spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction / E. Brailoiu, M. D. Miyamoto, N. J. Dun Neuropharmacology. — 2003. — Vol. 45. — P. 691–700.
7. Zhang Z. Inositol hexaphosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with suppression of colon carcinogenesis in rats / Z. Zhang, Y. Song, X. L. Wang // *World J. Gastroenterol.* — 2005. — Vol. 11. — P. 5044–5046.
8. Cordell D. The story of phosphorus: global food security and food for thought / D. Cordell, J-O. Drangert, S. White // *Global Envir Change*. — 2009. — Vol. 19. — P. 292–305.
9. Jones G. How to choose the best phytase when drawing up the ration / G. Jones // «*Testovik*». — 2014. — № 10. — P. 102–103.
10. Rarrezubov O. Fitaza. What has changed over the past 15 years / O. Rarkozubov // *J. Feed*. — 2014. — № 12. — P. 71–74.
11. Trufanov O. V. Fitase in the feeding of farm animals and birds. Kiev: Polygrfinko, 2011. 112 p.
12. Kornegay E.T. 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). Finnfeeds Marlborough Wiltshire UK, CABI Publ., 2000. P. 237–272.
13. Abdel-Hack M. E. The uses of microbial phytase as feed additive in poultry nutrition — A review / M. E. Abdel-Hack, M. Alagawany, M. Arif, M. Emam, M. Saeed, M. A. Arain, F. A. Siyal, A. Patra, S. S. Elnesr, R. U. Khan // *Ann. Anim. Sci.* — 2018. — Vol. 18. — P. 639–658.
14. Anderson P. A. Interactions between proteins and constituents that affect protein quality. In: *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds*. St Paul, MN. American Association of Cereal Chemists, Inc. 1985. P. 31–45.
15. Cosgrove D. J. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates / D. J. Cosgrove // *Reviews of Pure and Applied Chemistry*. — 1966. — Vol. 16. — P. 209–224.
16. Nouredдини H. Degradation of phytase in Distillers' grains and gluten feed by *Aspergillus niger* phytase / H. Nouredдини, J. Dang *Applied Biochemistry and Biotechnology*. — 2008. — Vol. 159. — P. 11–23.
17. Kies A. K. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase in vitro studies / A. K. Kies, L. H. De Jonge, P. A. Kemme, A. W. Jongbloed // *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. — 2006. — № 54. — P. 1753–1758.
18. Cowieson A. J. Phytic Acid and Phytase: Implications for Protein Utilization by Poultry / A. J. Cowieson, T. Acamovic, M. R. Bedford // *Poultry Science*. — 2006. — Vol. 85. — P. 878–885.
19. Cowieson A. J. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in broiler / A. J. Cowieson, J. P. Ruckebusch, J. O. B. Sorbara, J. W. Wilson, P. Guggenbuhl, F. F. Roos // *Animal Feed Science and Technology*. — 2017. — Vol. 225. — P. 182–194.
20. Yu S. Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin / S. Yu, A. Cowieson, C. Gilbert, P. Plumstead, S. Dalsgaard J. *Anim. Sci.* — 2012. — Vol. 90. — P. 1824–1832.
21. V. Sommerfeld, S. Кьнzel, M. Schollenberger, I. Кьhn, Rodehutsord M. Influence of phytase or myo-inositol supplements on performance and phytate degradation products in the crop, ileum, and blood of broiler chickens. *Poultry Science*. — 2018. — Vol. 97. — P. 920–929.
22. Onyango E. M. Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks / E. M. Onyango, M. R. Bedford, O. Adeola // *Poultry Sci.* — 2005. — № 84. — P. 248–255.
23. Champagne E. T. NMR and ESR studies of interactions among divalent cations, phytic acid, and N-acetyl-amino acids / E. T. Champagne, M. S. Fisher, O. Hinojosa // *Journal of Inorganic Biochemistry*. — 1990. — Vol. 38. — P. 199–215.
24. Mothes R. Rapeseed protein — polyanion interactions. Soluble complexes between the 2S protein fraction (napin) and phytic acid / R. Mothes, K. D. Schwenke, D. Zirwer, K. Gast // *Die Nahrung*. — 1990. — № 34. — P. 375–385.
25. Cowieson A. J. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens / A. J. Cowieson, V. Ravindran // *British Journal of Nutrition*. — 2007. — Vol. 98. — P. 745–752.
26. Adeola O. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production / O. Adeola, A. J. Cowieson // *J. Anim. Sci.* — 2011. — Vol. 89. — P. 3189–3218.
27. Rutherford S. M. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in broiler chickens / S. M. Rutherford, T. K. Chung, P. J. Moughan // *Br. Poult. Sci.* — 2002. — № 44. — P. 598–606.
28. Vasquez M.V. and Glitsoe V. Phytase Unit Myth! 2012. https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/2012_Phytase_unit_myths.pdf.
29. Gontia-Mishra I. Molecular Characterization and Comparative Phylogenetic Analysis of Phytases from Fungi with Their Prospective Applications. *Food Technol* / I. Gontia-Mishra, S. Tiwars // *Biotechnol.* — 2013. — Vol. 51. — P. 313–326.
30. Elkhailil K. A. I. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens / K. A. I. Elkhailil, K. Manner, O. R. Borriess, O. Simon // *British Poultry Science*. — 2007. — Vol. 48. — P. 64–70.