

СЕЛЕЗНЬОВА
Олександра Олександрівна

УДК 577.15 + 636.52/58:612.015.1

**РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ
ЕКЗОГЕННИХ ФЕРМЕНТІВ
ШЛЯХОМ ЇХ ІММОБІЛІЗАЦІЇ**

(03.00.04 — біохімія)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

577.1

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00802564 (P)

На правах рукопису

СЕЛЕЗНЬОВА
Олександра Олександрівна

УДК 577.15+636.52/58:612.015.1

РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ
ЕКЗОГЕННИХ ФЕРМЕНТІВ
ШЛЯХОМ ЇХ ІММОБІЛІЗАЦІЇ

(03.00.04 — біохімія)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

А/В 28.016

Робота виконана в проблемній еколого-біотехнологічній лабораторії Білоцерківського сільськогосподарського інституту.

Науковий керівник — член-кореспондент УААН, доктор біологічних наук, професор **Герасименко В. Г.**

Офіційні оponentи: доктор біологічних наук **Лазарев А. П.**
доктор біологічних наук **Маслянюк Р. П.**

Провідна установа — Дніпропетровський державний аграрний університет.

Захист дисертації відбудеться «28» жовтня 1993 р.
о 13 годині на засіданні спеціалізованої ради Д.120.17.01 при Львівській академії ветеринарної медицини.

Адреса: 290010, м. Львів, вул. Пекарська, 50.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Львівської академії ветеринарної медицини.

Автореферат розісланий «21» вересня 1993 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
доцент

Є. М. МАКУХ

НБ ім. В. Стефаника
АН України

1993 — 1993

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Однією із основних проблем тваринництва є пошук шляхів підвищення засвоюваності поживних речовин корму. Недостатня активність ендогенних травних ферментів компенсується введенням в раціони сільськогосподарських тварин і птиці екзогенних гідролітичних ферментів. Проте, ферментні препарати, що застосовуються, відзначаються нестабільністю дії внаслідок часткової або повної їх інактивації в шлунково-кишковому тракті під дією сильноокислого середовища, інгібіторів, протеаз.

Збільшити ефективність екзогенних ферментів можливо за рахунок створення стабілізованих форм біопрепаратів з використанням принципів і методів інженерної ензимології (І. В. Березін та ін., 1976, 1982, 1990; М. Тривен, 1984; Дж. Вудворд, 1988; Дж. Бейлі, Д. Олліс, 1989; J. Rogalski et al., 1985; К. Mosbach, 1976; M. Kitaoka et al., 1989).

Модифіковані шляхом іммобілізації ферменти знайшли широке застосування в біотехнологічних виробництвах і медицині, проте в тваринництві та ветеринарній медицині цілеспрямованих досліджень по створенню стабілізованих препаратів практично не проводилося.

В зв'язку з зазначеним вище, конструювання стійких до зовнішнього впливу біокатализаторів пролонгованої та спрямованої дії перспективне для підвищення резистентності, продуктивності та відтворювальної здатності сільськогосподарських тварин і птиці. Безперечний інтерес становить також вивчення механізму дії іммобілізованих ферментів в умовах *in vivo*.

Мета і завдання досліджень. Метою наших досліджень було створення стабілізованих шляхом іммобілізації ферментних препаратів та вивчення їх впливу на метаболічні процеси та продуктивність курчат-бройлерів. Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

- вивчити вплив фізико-хімічних параметрів на процес іммобілізації ферментних препаратів;
- дати порівняльну характеристику властивостей нативних та іммобілізованих ферментів в умовах *in vitro*;
- вивчити вплив згодовування іммобілізованих ферментів на процеси трансформації поживних речовин корму в організмі курчат-бройлерів;

— скласти рекомендації по ефективному використанню ферментних препаратів.

Наукова новизна. Вперше проведена іммобілізація екзогенних ферментів протосубтилін Г20х та целотерин ГЗх з метою використання їх в годівлі тварин і птиці. В результаті проведених досліджень визначені оптимальні умови для адсорбції на цеоліті вищезгаданих ферментів. Показано збільшення стабільності із збереженням високої каталітичної активності одержаних препаратів. Установлено, що іммобілізовані біокаталізатори підвищують рівень використання поживних речовин корму, сприяють інтенсифікації обмінних процесів та збільшенню продуктивності курчат-бройлерів.

Практичне значення роботи. Розроблена технологія приготування іммобілізованих ферментних препаратів. В науково-господарському досліді на курчатах-бройлерах установлено, що застосування стабілізованих ферментів із розрахунку 5,6 од. протеолітичної активності для протосубтиліну Г20х та 30 од. целюлолітичної активності для целотерину ГЗх на 1 кг корму підвищує приріст живої маси та знижує витрати корму на одиницю продукції.

Апробація роботи. Результати досліджень доповідалися на Республіканській науково-практичній конференції «Використання природних цеолітів Сокирницького родовища в народному господарстві» (м. Виноградovo Закарпатської обл., 1990), на VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), на науковій конференції, присвяченій 70-річчю Дніпропетровського сільськогосподарського інституту (Дніпропетровськ, 1993), на науково-практичній конференції «Біотехнологія ветеринарних препаратів» (Харків, 1993).

Публікації. Матеріали дисертації викладені в п'яти роботах, в тому числі в двох опублікованих роботах, одному патенті на винахід.

Об'єм і структура роботи. Дисертація викладена на 152 сторінках машинописного тексту і складається з вступу, огляду літератури, власних досліджень і обговорення їх результатів, заключення, висновків, пропозицій виробництву та списку використаної літератури (270 джерел, в т. ч. — 109 зарубіжних). Робота ілюстрована 17 таблицями та 11 малюнками.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили в еколого-біотехнологічній лабораторії та виваріумі Білоцерківського сільськогосподарського інституту протягом 1987—1991 років.

Для іммобілізації використовували ферментні препарати протосубтилін Г20х та целотерин ГЗх Ладижинського біохімічного заводу, в якості носія був використаний цеоліт тонкого помелу сорту А Сокирницького родовища Закарпатської області.

Імобілізацію протосубтиліна Г20х проводили при рН 7,2 в 10 мл фосфатного буферу протягом двох годин при постійному перемішуванні з розрахунку 60 мг ферменту на 1 г носія. Імобілізацію целотерину Г3х проводили в 10 мл води протягом 0,5 годин при постійному перемішуванні та навантаженні 200 мг ферменту на 1 г носія. Одержані препарати відділяли фільтруванням з подальшим просушуванням при 20—25 °С.

Залежність каталітичної активності від рН визначали при 30 °С інкубуючи на протязі двох годин нативні та іммобілізовані ферменти з однаковою початковою активністю в буферних розчинах із значенням рН від 1,5 до 8,0 (крок 1 од.). Величину рН визначали на рН-метрі «М-120». Залежність каталітичної активності від температури оцінювали в інтервалі 20—100 °С, витримуючи розчини нативних та іммобілізованих ферментів в буфері при заданій температурі протягом 30 хв. Кількість білка на носії визначали за зниженням його концентрації в реакційній суміші, яка вимірювалася за О. Н. Lowry et al. (1951). Максимальну швидкість ферментативної реакції та константу Міхаеліса знаходили графічним методом Лайнуівера-Берка.

Каталітичну активність протосубтиліна Г20х визначали за протеолітичною активністю модифікованим методом Ансона за ГОСТом 20264.2—88. Каталітичну активність целотерину Г3х визначали за целюлолітичною активністю, використовуючи як субстрат фільтрувальний папір і визначаючи кількість відновлених цукрів фериціанідним методом Т. Ghose et al. (1981), який описаний А. П. Синициним та ін. (1990).

В науково-господарському досліді вивчали вплив іммобілізованих ферментів на біохімічні показники та продуктивність курчат-бройлерів кроса «Бройлер-6». Групи формувалися із добових курчат, по 50 голів в групі. Утримання — кліткове. Годівлю здійснювали за нормами ВАСГНІЛ (1983) для сільськогосподарської птиці. Ферменти вводили в корми ступінчасто, в дозах, які рекомендовані методичними вказівками ВНДІТІП (1986), згідно зі схемою досліду (табл. 1).

В 56-денному віці курчат через 2 години після годівлі декапітували, відбирали проби тканин грудного, стегнового м'язів, печінки, крові, вмісту вола, залозистого шлунка, хімуса дванадцятипалої кишки, слизової тонкого кишечника. Первинну обробку досліджуваного матеріалу проводили на холоді.

У відібраних пробах визначали вміст загального білка за О. Н. Lowry et al. (1951), амілолітичну активність за кількістю розщепленого крохмалю за ГОСТом 20264.4—89 (1989), протеолітичну та целюлолітичну активність методами, що описані вище для ферментних препаратів, активність амінотрансфераз — за Т. С. Пасхіною (О. О. Покровський, 1969), активність лужної фосфатази — за А. Bodansky (О. О. Покровський, 1969), РНК та

Схема науково-господарського досліду, n=50

Групи	Добавки, що вводилися в основний раціон (ОР)	Кількість на 1 кг корму
Контроль I	ОР	—
Дослідні: II	ОР+целіт	2,5 г
III	ОР+протосубтилін Г20х нативний	5,6 од. протеолітичної активності
IV	ОР+протосубтилін Г20х іммобілізований	5,6 од. протеолітичної активності
V	ОР+целотерин Г3х нативний	30 од. целюлолітичної активності
VI	ОР+целотерин Г3х іммобілізований	30 од. целюлолітичної активності
VII	ОР+протосубтилін Г20х нативний+целотерин Г3х нативний	5,6 од. протеолітичної активності+30 од. целюлолітичної активності
VIII	ОР+протосубтилін Г20х іммобілізований+целотерин Г3х іммобілізований	5,6 од. протеолітичної активності+30 од. целюлолітичної активності

ДНК — за Р. Г. Цаневим і Г. Г. Марковим (1960), загальні, білкові та сульфгідрильні групи низькомолекулярних сполук спектрофотометрично на СФ-16 за Е. Л. Ellman (1959), глікоген — «прямим методом», який викладено Н. П. Мешковою та С. Е. Северіним (1979), глюкозу — ферментативно біотестом Lachema (Чехословаччина) на ФЕК-56М. Відносну поживну цінність м'яса визначали з допомогою тест-об'єкта Тетрахімена піриформіс за методикою, що описана В. Я. Шаблій та ін. (1983).

Одержані цифрові дані обробляли біометричним методом (В. М. Мончевичюте-Ерінгеме, 1964).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Модельні досліді по оптимізації умов для іммобілізації ферментних препаратів

В дослідіах *in vitro* нами визначені оптимальні умови для стабілізації ферментних препаратів протосубтиліну Г20х та целотерину Г3х відповідно протеолітичного та целюлолітичного спектрів дії. Іммобілізацію ферментів здійснювали адсорбційним методом з використанням у якості носія природного алюмосилікату — цеоліту. Обраний поліаніонний носій має високі адсорбуючі власти-

вості і, що суттєво, використовується в годівлі сільськогосподарської птиці.

Процес адсорбції ферменту на носію відбувається, в основному, за рахунок електростатичної взаємодії між макромолекулою білка та поверхнею носія, тому ми вивчили ряд чинників (значення рН, температури, складу та іонної сили розчину, часу інкубації, кількісного співвідношення носія, фермента та розчину), правильний вибір котрих обумовлює успішне проведення іммобілізації.

В табл. 2 наведені оптимальні фізико-хімічні параметри для адсорбції ферментів, при яких протосубтилін Г20х зберіг 85,7%, а целотерин Г3х — 68% каталітичної активності нативних попередників. При цьому нами встановлено, що активність модифікованого протосубтиліну Г20х зменшується в ряду буферів: фосфатний, цитратний, боратний, ацетатний, а модифікованого целотерину Г3х в ряду: ацетатний, фосфатний, боратний. Із збільшенням іонної сили розчину, незалежно від його складу, ферментативна активність препаратів, які були одержані, знижувалася. Досліди, проведені нами, показали збереження високої каталітичної активності (65%) целотерину Г3х при іммобілізації його у воді, що дозволило значно спростити та здешевити технологію приготування іммобілізованого препарату. Протосубтилін Г20х при іммобілізації у воді втрачав 80% початкової активності.

Таблиця 2

Фізико-хімічні параметри іммобілізації ферментів (носії — цеоліт)

Показники	Ферментні препарати	
	протосубтилін Г20х	целотерин Г3х
Середовище	фосфатний буфер	ацетатний буфер
рН	7,0—7,4	5,8—6,2
Температура, °С	20—25	20—25
Концентрація ферменту, мг/10 мл	60	200
Ємкість носія, мг/1 г		
максимальна	29,8	23,0
оптимальна	22,5	19,6
Час, хв	120	30
Спосіб	перемішування	перемішування
Активність ферменту: од/г	3,6	8,7
%	85,7	68,0

В результаті досліджень по визначенню максимальної кількості білка, здатного адсорбуватися на поверхні носія, нами була знайдена оптимальна ємкість цеоліту, яка відповідає найбільшому виходу ферментативної активності (табл. 2). При максимальному

навантаженні носія відбувалося зниження питомої активності ферментів.

2. Вивчення властивостей іммобілізованих ферментів в умовах *in vitro*

Результати модельних дослідів по порівняльному вивченню властивостей нативних та іммобілізованих ферментів дозволили виявити переваги стабілізованих препаратів щодо таких денатуруючих чинників як рН і температура.

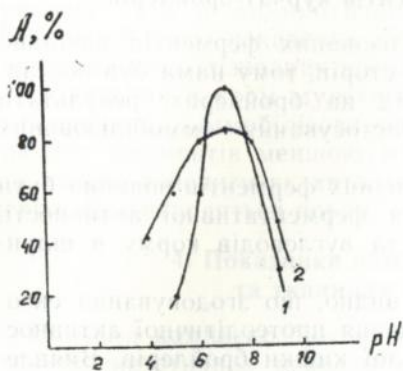
Після двогодинної інкубації в буферних розчинах в інтервалі рН від 1,5 до 8,0 іммобілізовані ферменти зберегли достатню каталітичну активність при значеннях рН, критичних для нативних препаратів. Графічне зображення рН-залежності активності нативного та іммобілізованого протосубтиліну Г20х показало значне розширення рН-профілю в бік кислої зони для стабілізованого ферменту (мал. 1), що особливо важливо при використанні його в фізіологічних умовах. Для нативного та іммобілізованого протосубтиліну Г20х рН-оптимуми збігалися і відповідали значенню 7,2. При рН 4,0 нативний фермент необоротньо інактивувався, в той час, як іммобілізований зберігав 42% своєї початкової активності.

Для іммобілізованого целотерину Г3х спостерігали розширення рН-профілю як в кислу, так і в лужну зони (мал. 2), і при значеннях рН 2,0 і 8,0 відбувалося зниження каталітичної активності лише на 14 і 8% відповідно. Нативний целотерин при рН 2,0 зберіг 20% активності, а при рН 8,0 — 30%. рН оптимум для нативного целотерину знаходиться в інтервалі 4,8—5,8, для іммобілізованого ферменту він був зміщений на одиницю в лужну зону.

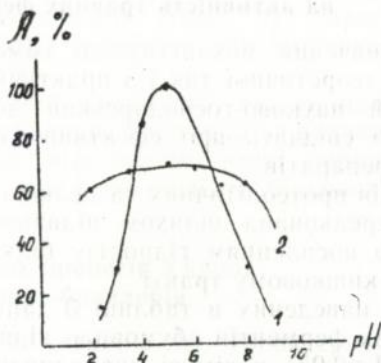
Криві термоінактивації нативного та іммобілізованого протосубтиліну Г20х свідчать про те, що після 20-годинної інкубації ферментів при 60 °С стабілізований протосубтилін Г20х втрачав 50% активності, нативний — 90% (мал. 3).

Криві термоінактивації нативного та іммобілізованого целотерину Г3х мали різний характер (мал. 4), що можна пояснити складом целотерину Г3х, до якого входить комплекс целюлолітичних ферментів, що мають різну адсорбуючу здатність при іммобілізації. Нативний целотерин інактивувався після 15-годинної інкубації при 60 °С; іммобілізований зберіг 40% активності після 20-годинної інкубації при 60 °С.

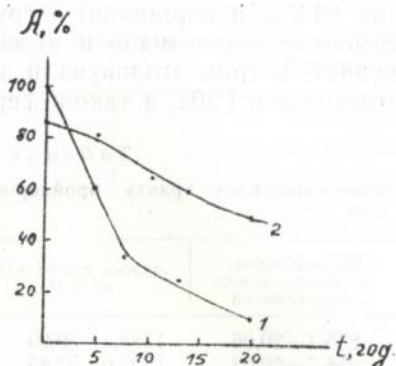
Константа Михаеліса та максимальна швидкість ферментативної реакції при іммобілізації протосубтиліну Г20х не змінилися. Іммобілізація целотерину Г3х сприяла збільшенню уявної константи Михаеліса в 1,4 рази і зменшенню швидкості розкладу фермент-субстратного комплексу в 2,2 рази.



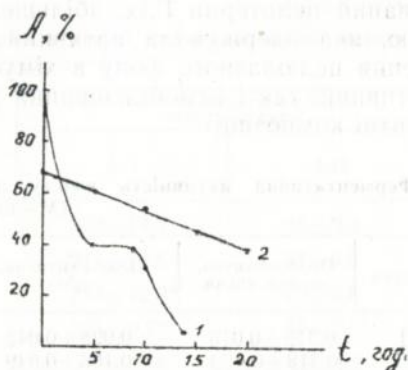
Мал. 1. pH-залежність активності нативного (1) та іммобілізованого (2) протосубтиліну.



Мал. 2. pH-залежність активності нативного (1) та іммобілізованого (2) целотерину.



Мал. 3. Криві термоінактивації протосубтиліну нативного (1) та іммобілізованого (2).



Мал. 4. Криві термоінактивації целотерину нативного (1) та іммобілізованого (2).

3. Вплив згодовування іммобілізованих препаратів на активність травних ферментів курчат-бройлерів

Вивчення механізму дії іммобілізованих ферментів важливо як з теоретичної так і з практичної сторін, тому нами був поставлений науково-господарський дослід на бройлерах, результати якого свідчать про ефективність застосування іммобілізованих біопрепаратів.

Дія протеолітичних та целюлолітичних ферментів повинна бути опосередкована шляхом підвищення ферментативної активності, тобто посиленням гідролізу білків та вуглеводів корму в шлунково-кишковому тракті.

З наведених в таблиці 3 даних видно, що згодовування екзогенних ферментів обумовило підвищення протеолітичної активності ($P < 0,05$) в хімісі дванадцятипалої кишки бройлерів. Виявлені суттєві міжгрупові відмінності дають підставу стверджувати, що іммобілізовані ферменти функціонально активніші ніж нативні. В хімісі курчат, які одержували нативний та іммобілізований протосубтилін Г20х, протеолітична активність збільшилась відповідно на 55,2% ($P < 0,02$) та 75,2% ($P < 0,05$), а нативний та іммобілізований целотерин Г3х — на 50,1% ($P < 0,05$) та 78,7% ($P < 0,02$). Значне збільшення протеолітичної активності під впливом іммобілізованого целотерину Г3х, фермента целюлолітичного спектра дії, викликано, на нашу думку, підвищенням доступності компонентів деградованих ним рослинних клітин дії ендогенних протеаз. Підтвердженням цьому є наведені в табл. 3 дані визначення целюлолітичної активності. Целюлолітична активність хіміуса дванадцятипалої кишки бройлерів, в раціон яких входив іммобілізований целотерин Г3х, збільшена на 94,2% в порівнянні з групою, яка одержувала нативний фермент. Слід визначити підвищення целюлазного фону в хімісі курчат, котрим згодовували як нативний, так і іммобілізований протосубтилін Г20х, а також ферментні композиції.

Таблиця 3.

Ферментативна активність вмісту шлунково-кишкового тракту бройлерів ($M \pm m$; $n = 5$)

Групи	Протеолітична, мк-екв. тір/хв.	Целюлолітична, од/мл	Амілолітична, мг розщепленого крохмалю/мл	Лужна фосфатаза, мг % Р
I	0,315 ± 0,016	0,098 ± 0,045	255,1 ± 20,06	1588,5 ± 59,05
II	0,313 ± 0,020	0,106 ± 0,049	256,7 ± 20,03	1505,0 ± 37,85
III	0,489 ± 0,038*	0,442 ± 0,088	285,0 ± 16,32	1817,2 ± 51,11*
IV	0,552 ± 0,052*	0,774 ± 0,061*	391,1 ± 12,50*	2180,0 ± 113,50*
V	0,473 ± 0,049*	1,350 ± 0,072*	292,9 ± 17,79	2400,2 ± 39,19*
VI	0,563 ± 0,050*	2,428 ± 0,144*	327,9 ± 19,25*	2723,5 ± 49,05*
VII	0,450 ± 0,056*	0,860 ± 0,066*	287,8 ± 12,93	1916,5 ± 37,58*
VIII	0,465 ± 0,041*	0,984 ± 0,165*	301,8 ± 26,25	2504,7 ± 51,97*

* $P < 0,05$.

Введення в раціон бройлерів нативних ферментів не викликало суттєвих змін в амілолітичній активності (табл. 3). Вірогідне збільшення цього показника ($P < 0,05$) відмічено при згодовуванні курчатом іммобілізованих препаратів.

Додавання в корм мультіензимної композиції, яка складається із нативних і іммобілізованих ферментів, вплинуло на активність травних ферментів меншою мірою, ніж окремо взяті ферменти, що можна пояснити як автолізом, так і протеолізом білкових молекул, що знаходяться поряд.

4. Показники обмінних процесів в крові та тканинах курчат-бройлерів

Вивчили комплекс біохімічних показників, що характеризують стан біосинтетичних процесів з метою збереження напруженості метаболічних реакцій, які відбуваються в організмі птиці при введенні в корм іммобілізованих ферментів.

В результаті проведених досліджень (табл. 4) встановили, що вміст загального білка в хімусі дванадцятипалої кишки курчат, які одержали іммобілізований протосубтилін Г20х зменшився на 27,4% ($P < 0,05$), а при використанні іммобілізованого целотерину Г3х на 32,4% ($P < 0,05$), що корелює із збільшенням протеолітичної активності в цих групах і свідчать про підвищення швидкості гідролізу білків корму та посилення всмоктування продуктів розщелення. Згодовування нативних ферментів суттєво не вплинуло на рівень білка у вмісті кишечника.

Таблиця 4

Вміст білка і активність амінотрансфераз в хімусі дванадцятипалої кишки бройлерів ($M \pm m$; $n = 5$)

Групи	Білок, мг %	Активність амінотрансфераз, мкМ піривату	
		АсТ	АлТ
I	3447 ± 193,1	239 ± 14,7	45 ± 3,4
II	3323 ± 219,6	244 ± 14,6	41 ± 3,0
III	3423 ± 247,1	284 ± 12,3*	49 ± 3,8
IV	2687 ± 219,1*	305 ± 9,7*	55 ± 2,5*
V	3743 ± 283,7	310 ± 15,8*	48 ± 4,2
VI	2585 ± 263,8*	340 ± 11,6*	60 ± 2,8*
VII	3374 ± 304,0	266 ± 13,5	45 ± 3,4
VIII	2890 ± 163,9	320 ± 13,6*	48 ± 3,4

* $P < 0,05$.

В сироватці крові бройлерів дослідних груп (табл. 6) концентрація білка не відрізнялась від контролю. Зміни в білковому спектрі печінки та м'язів (табл. 5, 7) відбувалися неоднозначно, певно, в наслідок специфічності цих тканин. Проте, іммобілізовані ферменти сприяли збільшенню вмісту білка в печінці та стегновому м'язі на вірогідну величину ($P < 0,05$).

Односпрямованість змін метаболізму білка та нуклеїнових кислот, зокрема РНК, спостерігалася нами при визначенні концентрації РНК та ДНК в печінці бройлерів (табл. 5). Найбільша білок-синтезуюча здатність була встановлена в групах курчат, які одержували іммобілізовані ферменти. Вміст РНК в печінці збільшився при додаванні іммобілізованого протосубтиліну Г20х на 48,9% ($P < 0,01$), іммобілізованого целотерину Г3х — на 49,5% ($P < 0,001$); нативні протосубтилін Г20х та целотерин Г3х викликали збільшення концентрації РНК відповідно на 26,3% ($P < 0,02$) та 29,0% ($P < 0,01$).

Введення іммобілізованих препаратів підвищило активність ферментів переамінування, особливо аспартатамінотрансферази, в слизовій тонкого кишечника бройлерів (табл. 4), помітно не впливаючи при цьому на їх активність в крові (табл. 6). В печінці курчат, що одержували іммобілізовані ферменти, виявлено вірогідне збільшення активності амінотрансфераз (табл. 5), проте в такому поліфункціональному органі, як печінка, активізація ферментів переамінування може бути викликана не тільки синтезом білка, але і іншими процесами, які в ній відбуваються.

Активність лужної фосфатази (табл. 3) в слизовій тонкого кишечника була збільшена у всіх групах бройлерів, котрим згодували ферментні препарати. Найбільша фосфатазна активність була встановлена в слизовій кишечника курчат, які одержували як нативний ($P < 0,001$), так і іммобілізований ($P < 0,001$) целотерин Г3х.

В сироватці крові курчат, в раціон яких включали іммобілізований целотерин Г3х, активність лужної фосфатази була також підвищена ($P < 0,005$); в решті дослідних груп вона залишалася на рівні контролю (табл. 6).

Отримані нами дані свідчать про активізацію процесів гідролізу вуглеводів, які надходять з кормом, що містить іммобілізовані ферменти. Іммобілізовані препарати викликали вірогідне збільшення глюкози в сироватці крові (табл. 6); в інших дослідних групах спостерігали тенденцію до її збільшення. Посилення целюлолітичної активності сприяло накопиченню глікогену в печінці курчат (табл. 5), що одержували іммобілізований протосубтилін Г20х, на 8,6% ($P < 0,05$), іммобілізований целотерин Г3х — на 22,8% ($P < 0,001$) та мультиензимну композицію іммобілізованих ферментів на 4,1% ($P < 0,05$).

Таблиця 5

Біохімічні показники печінки бройлерів
($M \pm m$; $n=5$)

Групи	Білок, мг/г сирової тканини	Нуклеїнові кислоти, мг % Р		Активність амінотрансфераз, мкМ пірувату		Глікоген, мг %
		ДНК	РНК	АсТ	АлТ	
I	148,6±5,45	4,3±0,37	21,5±0,88	417±26,4	57,6±4,28	1738±67,8
II	145,4±7,46	4,5±0,39	21,9±0,78	393±16,7	55,2±2,78	1630±48,3
III	163,4±6,23	4,9±0,36	27,1±1,01*	477±32,7	56,4±2,20	1881±43,7
IV	183,6±9,77*	4,6±0,54	31,9±1,17*	580±31,0*	70,2±3,09*	2032±54,6*
V	174,4±5,97*	3,9±0,31	27,7±1,03*	532±20,3*	76,8±6,19*	2005±44,3*
VI	182,6±6,05*	6,6±0,53*	32,1±0,82*	559±40,9*	86,4±3,47*	2104±48,7*
VII	153,4±9,44	4,5±0,41	22,7±0,88	453±25,8	76,8±5,16*	1771±41,8
VIII	180,2±13,28	4,2±0,37	22,1±0,99	549±31,2*	78,6±7,96*	1942±49,2*

* $P < 0,05$.

Таблиця 6

Біохімічні показники сироватки крові бройлерів
($M \pm m$; $n=5$)

Групи	Білок, г %	Глюкоза, мг %	Активність амінотрансфераз, мкМ пірувату		Лужна фосфатаза, мг % Р
			АсТ	АлТ	
I	3,65±0,13	218,7±6,47	1,12±0,069	0,24±0,018	27,3±0,95
II	3,69±0,08	226,0±19,04	1,12±0,040	0,25±0,022	26,6±0,55
III	3,91±0,04	247,3±12,32	1,20±0,079	0,28±0,022	29,3±1,22
IV	3,95±0,08	277,3±15,55*	1,31±0,118	0,31±0,019*	28,8±0,81
V	3,67±0,09	252,8±24,01	1,35±0,088	0,27±0,027	29,3±1,88
VI	3,94±0,11	265,6±12,19*	1,30±0,074	0,34±0,095	33,3±1,18*
VII	3,74±0,06	247,1±20,74	1,24±0,106	0,27±0,021	27,0±0,81
VIII	3,88±0,12	254,1±24,77	1,24±0,134	0,30±0,027	29,2±0,75

* $P < 0,05$.

Продуктивність і якість м'яса бройлерів
($M \pm m$; $n=5-50$)

Групи	Кількість білку в м'язах, мг/г сирої тканини		Маса на кінець дослідю, г	Відносна поживна цінність, %	Витрати корму на 1 кг при- росту, кг
	грудинний	стегновий			
I	233,4 \pm 6,35	195,4 \pm 8,21	1358,0 \pm 43,04	100,0	2,57
II	235,0 \pm 9,67	198,4 \pm 8,18	1318,0 \pm 41,67	106,8	2,63
III	222,6 \pm 10,20	225,4 \pm 7,74*	1471,5 \pm 54,40	105,1	2,44
IV	256,4 \pm 13,69	230,6 \pm 6,67*	1566,0 \pm 61,77*	110,9	2,32
V	234,8 \pm 18,25	194,0 \pm 5,77	1487,5 \pm 54,96	106,8	2,41
VI	254,0 \pm 10,08	230,2 \pm 8,13*	1634,0 \pm 56,85*	99,6	2,30
VII	233,6 \pm 6,82	207,2 \pm 4,65	1309,5 \pm 56,73	101,0	2,63
VIII	246,8 \pm 11,18	232,4 \pm 7,35*	1605,5 \pm 56,83*	105,4	2,33

* $P < 0,05$.

5. Вплив іммобілізованих ферментів на живу масу бройлерів та витрату кормів

Наведені в табл. 7 дані свідчать, що найбільша продуктивність була одержана в групах курчат, які отримували іммобілізовані ферменти. Включення в раціон іммобілізованого протосубтиліну Г20х, який містить 5,6 од. протеолітичної активності, забезпечило збільшення приросту живої маси на 15,3% ($P < 0,05$), іммобілізованого целотерину Г3х, який містить 30 од. целюлолітичної активності, на 20,3% ($P < 0,01$). При цьому витрати корму на 1 кг приросту були зменшені на 10,7% при введенні іммобілізованого протосубтиліну Г20х та на 11,1% — іммобілізованого целотерину Г3х. Використання в годівлі бройлерів мультиензимної композиції із іммобілізованих ферментів призвело до збільшення живої маси на 18,2% ($P < 0,01$) та зменшенню витрат корму на 10,3%.

Відносна поживна цінність м'яса курчат-бройлерів не зменшилась при введенні в корми як нативних, так і іммобілізованих ферментів (табл. 7).

ВИСНОВКИ

1. Встановлена можливість одержання стабілізованих ферментних препаратів протосубтиліну Г20х протеолітичного спектру дії і целотерину Г3х целюлолітичного спектру дії з використанням в якості носія целюліти.

2. Визначені оптимальні фізико-хімічні параметри (рН, тем-

пература, час, склад та іонна сила розчину, концентрація ферменту, співвідношення інгредієнтів) процесу іммобілізації, при яких вихід активності для протосубтиліну Г20х складає 85,7%, для целотерину Г3х — 68%.

3. Вивчені кінетико-термодинамічні характеристики нативних і іммобілізованих протосубтиліну Г20х і целотерину Г3х, які свідчать про високу стабільність і каталітичну активність модифікованих препаратів в умовах, критичних для нативних форм.

4. Стабілізовані ферментні препарати, при введенні їх в комбікорм курчат-бройлерів, інтенсифікують і поглиблюють гідролітичні процеси в шлунково-кишковому тракті, що проявляється зниженням рівня білка, збільшенням протеолітичної, амілолітичної та целюлолітичної активностей, підвищенням активності амінотрансфераз та лужної фосфатази.

5. Збагачення комбікорму бройлерів іммобілізованими ферментами активізує процеси біосинтезу за рахунок підвищеного надходження продуктів катаболізму, про що свідчать збільшення концентрації білка, РНК і глікогену в печінці, накопичення білка в м'язах.

6. Введення іммобілізованих ферментів в комбікорма не впливає на активність ферментів переамінування в крові і м'язах, рівень білка в крові, що може бути свідченням регуляції метаболічного забезпечення анаболічних процесів.

7. Згодовування курчатам-бройлерам комбікормів, збагачених іммобілізованими ферментами в дозах 5,6 од. протеолітичної активності та 30 од. целюлолітичної активності на 1 кг корму, підвищує приріст живої маси на 15—20% і знижує витрати корму на 10—11%.

ПРАКТИЧНІ ПРОПОЗИЦІЇ

З метою ефективного використання дорогокоштуючих ферментних препаратів, а також для підвищення продуктивності і зниження витрат корму на одиницю продукції рекомендується збагачувати комбікорм курчат-бройлерів іммобілізованими протосубтиліном Г20х в дозі 5,6 од. протеолітичної активності і целотерином Г3х в дозі 30 од. целюлолітичної активності на 1 кг корму.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Герасименко В. Г., Битюцкий В. С., Селезнева А. А. Способ получения иммобилизованного препарата с глюкоамилазной активностью, используемого, предпочтительно для кормления цыплят. Заявка № 4844414/13 (045982) СССР, приоритет 23.04.90 г. Признана изобретением 16.12.91 г.

2. Герасименко В. Г., Битюцкий В. С., Распутный А. И., Девича И. А., Селезнева А. А., Прокопичина Т. Б. Использование цеолитовых пород Сокиришского месторождения для стабилизации биологически активных веществ // Ма

тернали Республіканської научно-практичної конференції «Использование природных пеолитов Сокирницького месторождения в народном хозяйстве». — Виноградovo, 23—24 окт. 1990 г. — Черкасы, 1991 г. — С. 76—77.

3. Герасименко В. Г., Селезньова О. О. Використання екзогенного протосубтиліну Г20х в кормових цілях //Тези доповідей VI Українського біохімічного з'їзду. — Київ, 1992. — Ч. 2. — С. 18.

4. Герасименко В. Г., Девича І. О., Селезньова О. О. Імобілізація ферментних препаратів протосубтиліну Г20х і целотерину Г3х на використання у тваринництві //Тези доповідей науковій конференції, присвяченій 70-річчю Дніпропетровського сільськогосподарського інституту. — Дніпропетровськ, 1993 (в друку).

5. Герасименко В. Г., Селезньова О. О. Стабілізація ферментного препарату протосубтилін Г20х з метою використання його в тваринництві та ветеринарії //Тези доповідей науково-практичної конференції «Біотехнологія ветеринарних препаратів». — Харків, 25—26 травня, 1993 (в друку).

Здано до набору 26. 07. 93. Підписано до друку 12. 08. 93. Формат 60×84/16.
Бумага друк. Друк високий. Ум. друк. арк. 0,93. Тираж 120 пр. Зам. 1730.

МПП «Білоцерківськдрук», 256400, м. Б. Церква, бул. Олександрійський, 22а.

462654

Ab 28.016

AV 28.016