

УДК 577.15 : 636.5.087.8 : 606

СЕЛЕЗНЬОВА О. О., sel1950@ukr.net

ЦЕХМІСТРЕНКО С. І., svetlana.tsehmistrenko@gmail.com

ПОЛІЩУК В. М., vitnik2007@ukr.net

ПОЛІЩУК С. А.

*Білоцерківський національний аграрний університет***СТАБІЛІЗАЦІЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ
ПРОТОСУБТИЛІН ГЗХ З МЕТОЮ ВИКОРИСТАННЯ
ЙОГО У ПТАХІВНИЦТВІ**

У статті представлено результати дослідження оптимальних умов для адсорбційної іммобілізації на цеоліті ферментного препарату протосубтилін ГЗХ:0,1М фосфатний буферний розчин із рН 7,0–7,4, температура 20–25 °С, ємність носія 22,5 мг/г, тривалість процесу 2 год. Встановлено, що за таких умов активність іммобілізованого ензиму відповідала 85,7 % активності нативної форми. Іммобілізований препарат виявив стабільність зі збереженням високої активності в умовах, критичних для нативного ензиму. При рН-інактивації нативної та іммобілізованої форм протосубтиліну ГЗХ втрати каталітичної активності модифікованого препарату були значно менше, ніж нативного, причому для іммобілізованого ферменту спостерігали значне розширення рН-профілю в кислій зоні. При рН 5,0 нативний фермент зберіг 20 % початкової активності і необоротно інактивувався в інтервалі рН 4,5–4,8, у той час як іммобілізований при рН 4,0 зберіг 42 % активності. Визначено ефективність використання стабілізованого препарату в дослідах на курчатах-бройлерах. Протеолітична активність травних ферментів у різних відділах шлунково-кишкового тракту бройлерів дослідної групи була достовірно вище, ніж у курчат контрольної групи. Зокрема в хімусі дванадцятипалої кишки у курчат групи, в раціон якої входив іммобілізований препарат, збільшення протеолітичної активності було вищим на 12,8 % порівняно з групою, що одержувала нативний фермент. Згодовування курчатам іммобілізованого протосубтиліну ГЗХ позитивно впливало на приріст живої маси і сприяло зменшенню витрат корму.

Ключові слова: ензим, іммобілізація, нативний фермент, цеоліт, адсорбція, протеолітична активність, рН, буферний розчин.

doi: 10.33245/2310-9289-2018-145-2-54-61

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Однією з основних проблем тваринництва є пошук шляхів підвищення засвоєння поживних речовин корму. Виробництво сучасної комбікормової продукції не обходиться без використання кормових ферментних препаратів, які дозволяють більш повно використовувати кормовий потенціал сировини, зменшувати час відгодівлі, знижувати вартість та витрати кормів [1, 2, 3].

Екзогенні ензимні добавки в комбікорми птиці прискорюють процес метаболізму за рахунок поглиблення гідролітичних процесів, сприяючи інтенсифікації засвоєння поживних речовин корму [4].

Так, застосування ферментів у раціонах бройлерів збільшує середньодобові прирости маси на 4–5 %, яйценосність курей-несучок – на 5 % при зниженні витрат кормів від 5 до 10 %, підвищує збереженість молодняку та поголів'я дорослих тварин на 3–5 % [5]. Введення до складу комбікорму для курчат-бройлерів ферментного препарату «НАТУФОС 5000» сприяє збільшенню маси бройлерів на 4,5% і середньодобових приростів на 6,1 % [1, 6].

Проте ензимні препарати, які застосовуються у тваринництві, виявляють нестабільність дії під впливом часткової або повної інактивації їх інгібіторами, протеазами, кислим середовищем травного каналу [3]. Крім того, ферментні препарати швидко втрачають активність при зберіганні [7, 8].

Збільшити ефективність використання екзогенних ферментних препаратів можливо за рахунок створення стабілізованих форм біопрепаратів із використанням принципів і методів інженерної ензимології [9, 10, 11].

Іммобілізовані препарати, на відміну від нативних, мають ряд переваг: пролонгованість дії, стійкість до денатуруючих агентів, підвищену стабільність, можливість відділення ферменту від продуктів реакції для повторного використання [8, 12].

Одним із ефективних і простих способів модифікації ферментних препаратів є їх адсорбція (іммобілізація) на природних носіях за рахунок електростатичних, гідрофобних, водневих зв'язків. Закріплення на носії сприяє обмеженню рухливості білкової молекули ферменту, суттєво послаблює взаємодію між окремими молекулами ферментів і тим самим запобігає автолізу [13, 14].

Головним недоліком фізичного методу іммобілізації є те, що фермент може зв'язуватися з носієм недостатньо міцно. Десорбцію ферменту можуть викликати незначні зміни зовнішніх умов: рН, йонна сила розчину, температура і природа розчинника [11, 15]. Крім того, у кожному конкретному випадку необхідно експериментально підбирати носій і умови для іммобілізації [16].

Особливе значення при іммобілізації надається носіям. Неорганічні носії повинні бути механічно, хімічно і біологічно стійкими в рідкому середовищі, не викликати конфірмаційних змін структури ензиму, мати низку вартість, легко гранулюватись і активізуватись. На визначення оптимальних режимів іммобілізації, що забезпечать високу каталітичну активність препарату та стабільність, спрямовуються сучасні дослідження та розробки [17, 18].

Модифіковані шляхом іммобілізації ферменти знайшли широке застосування в терапевтичних цілях у медицині, харчовій, текстильній, фармацевтичній, хімічній, шкіряній й промисловості тощо [8, 19, 20].

Так, у харчовій промисловості для процесу неперервного гідролізу крохмалю використовуються високостабільний гетерогенний біокаталізатор на основі адсорбованої глюкоамілази. Іммобілізована глюкоамілаза виявляє високу біокаталітичну активність через 1–1,5 років зберігання [21].

На основі гідролітичних ферментів розроблено гетерогенні біокаталізатори пролонгованої дії зі зниженою токсичністю та алергенністю, іммобілізовані на целюлозі, диальдегідцелюлозі та інших носіях для фармацевтичного призначення [8].

Перспективним є одержання іммобілізованих ферментних препаратів для використання їх у практиці кормовиробництва, тваринництва, птахівництва. Так, створений шляхом адсорбційної іммобілізації стабілізований фермент із протеолітичною активністю для годівлі сільськогосподарських тварин і птиці, сприяє збереженню активності ензиму під час проходження у травно-му каналі, а також при тривалому його зберіганні [22].

Іммобілізований на цеоліті ензим з глюкоамілазною активністю запропоновано використовувати у годівлі бройлерів. Встановлено, що даний препарат сприяє процесу глюконеогенезу з одночасним підвищенням швидкості гліколізу й активації процесів окиснення у тканинах [3].

Введення до комбікорму із дефіцитом Фосфору іммобілізованого Йоду з комплексом ферментних препаратів привело до збільшення маси перепелів на 7,2 % [23].

Таким чином, конструювання стійких до зовнішнього впливу ензимів пролонгованої дії дозволить значно підвищити ефективність використання ферментних препаратів, які застосовуються у тваринництві.

Метою дослідження є визначення оптимальних умов для стабілізації кормової ензимної добавки протосубтиліну ГЗХ, яка додається у раціон бройлерів, та порівняльна характеристика властивостей вільного та іммобілізованого ферменту в умовах *in vitro* та *in vivo*.

Матеріал і методика дослідження. Протеолітичну активність протосубтиліну ГЗХ визначали модифікованим методом Ансона за ГОСТ 20264.2–88 [24]. Кількість білка на носіїв оцінювали за зниженням його концентрації в реакційній суміші, яка вимірювалася за Lowry O.H. et al. [25]. Значення активності іммобілізованого ферменту виражали у відсотках від активності вільного ензиму. Величину рН буферних розчинів вимірювали на потенціометрі рН –340.

Для іммобілізації використовували ферментний препарат протосубтилін ГЗХ з активністю 70 од/г Ладижинського заводу біо- і ферментних препаратів «Ензим», в якості носія використовували цеоліт Сокирницького родовища Закарпатської області.

Дослідження проводили в еколого-біотехнологічній лабораторії та віваріумі БНАУ. В науково-господарському досліді вивчали вплив нативного та іммобілізованого ферментів на біохімічні показники та продуктивність курчат-бройлерів. Групи формувалися із добових курчат за принципом аналогів, по 50 голів у кожній групі. Перша група (контрольна) отримувала основний раціон (ОР), другій групі до основного раціону додавали нативний протосубтилін ГЗХ з протеолітичною активністю 5,6 одиниць на 1 кг корму, третій групі додавали іммобілізований протосубтилін ГЗХ з 5,6 од./ акт. на 1 кг корму. Утримання та годівлю курчат-бройлерів здійснювали згідно з зоотехнічними нормами для сільськогосподарської птиці.

Основні результати дослідження. У дослідях *in vitro* визначали оптимальні умови для стабілізації ферментного препарату протосубтилін ГЗХ протеолітичного спектру дії. Іммобілізацію проводили фізичним (адсорбційним) методом на природному алюмосилікаті – цеоліті. Ви-

браний поліаніонний носій забезпечує стабілізацію ферменту, а також використовується у годівлі птиці [26, 27].

Процес фізичної адсорбції ензиму на носії здійснюється, в основному, за рахунок електростатичної взаємодії між макромолекулою білка та поверхнею носія, тому в дослідях *in vitro* визначали оптимальні фізико-хімічні умови (значення рН, температури, складу та йонної сили розчину, часу інкубації, кількісного співвідношення носія, ферменту та розчину) для одержання препарату зі збереженням високої каталітичної активності (табл.1).

Таблиця 1 – Фізико-хімічні параметри іммобілізації протосубтиліну ГЗХ

№ п/п	Показники	Оптимальні параметри	
1.	Середовище	Фосфатний буфер 0,1М	
2.	рН	7,0–7,4	
3.	Температура, °С	20–25	
4.	Концентрація ферменту, мг/10 мл	60	
5.	Ємкість носія, мг/1 г		
		максимальна	29,8
		оптимальна	22,5
6.	Час, хв	120	
7.	Спосіб	перемішування	
8.	Активність ферменту: од./г%	3,6	
		85,7	

Процедура іммобілізації полягала в перемішуванні буферного розчину ферменту з носієм. При дослідженні впливу йонної сили розчину та значення рН на процес адсорбції встановлено, що каталітична активність одержаного препарату падає в ряді буферів: фосфатний, цитратний, боратний, ацетатний. Причому зі збільшенням йонної сили розчину, незалежно від його складу, ферментативна активність препарату знижувалася. Оптимальним для іммобілізації виявився фосфатний буферний розчин 0,1М із значенням рН в інтервалі 7,0–7,4. При іммобілізації у воді протосубтилін ГЗХ втрачав 80 % початкової активності.

При визначенні ємкості носія встановлено, що 1 г цеоліту адсорбує 29,8 мг білка. Проте оптимальне навантаження носія, при якому проявляється максимальна питома активність ферменту (0,16 од./мг білка), склала 22,5 мг білка на 1 г цеоліту і відповідала 85,7 % від активності нативного протосубтиліну ГЗХ.

Таким чином, визначено оптимальні умови для іммобілізації протосубтиліну ГЗХ на цеоліті: 0,1М фосфатний буферний розчин із рН 7,0–7,4, температура 20–25 °С, ємність носія 22,5 мг/г, тривалість процесу 2 год.

Для порівняльної характеристики властивостей вільного та іммобілізованого ензиму в дослідях *in vitro* вивчали залежність каталітичної активності від величини рН в діапазоні значень від 1,5 до 8,0. Під час годинної інкубації в буферних розчинах встановлено, що рН-оптимум для обох форм препаратів збігається (рН 7,2). При рН-інактивації нативної й іммобілізованої форм протосубтиліну ГЗХ втрати каталітичної активності модифікованого препарату були значно менше, ніж нативного ферменту, причому для іммобілізованого ферменту спостерігали значне розширення рН-профілю в кислій зоні. Якщо при рН 5,0 нативний фермент зберіг 20 % початкової активності і необоротно інактивувався в інтервалі рН 4,5–4,8, то іммобілізований при рН 4,0 зберіг 42 % активності. У лужному середовищі (рН 8–9) активність іммобілізованого ферменту, порівнянно з нативною формою, суттєво не змінилася (рис. 1).

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

Вивчали протеолітичну активність травних ферментів в різних відділах шлунково-кишкового тракту бройлерів: волю (рН 4,5–5,8), залозистий шлунок (рН 3,6–4,7), дванадцятипала кишка (рН 5,7–6,2).

Протеолітична активність вмісту волю в групах курчат, що отримували нативний та іммобілізований протосубтилін ГЗХ, була однаково і вірогідно вища, ніж в контрольній (р < 0,01). У залозистому шлунку спостерігали різке зниження, до рівня контрольної, протеолітичної актив-

ності в групі курчат-бройлерів, що отримували нативний фермент, у той час як цей показник в групі, яка отримувала іммобілізований препарат, був вищим на 30 % ($p < 0,05$). У хімусі дванадцятипалої кишки знову відмічали збільшення протеолітичної активності у курчат дослідних груп ($p < 0,05$), проте вона на 12,8 % вища в групі, в раціон якої входив іммобілізований препарат, у порівнянні з групою, що отримувала нативний фермент (табл. 2).

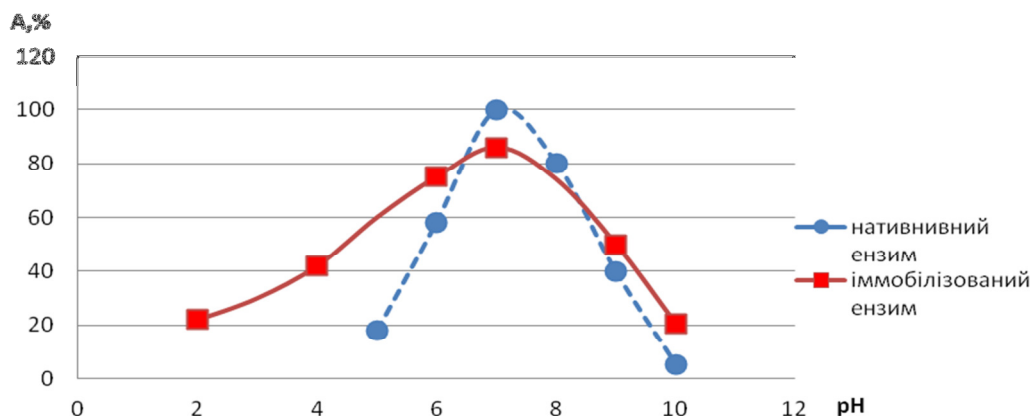


Рисунок 1. рН-залежність активності нативного та іммобілізованого протосубтиліну ГЗХ.

Необхідно відзначити, що в умовах *in vivo*, на відміну від аналогічних умов *in vitro*, спостерігалась часткова реактивація каталітичних властивостей нативного протосубтиліну ГЗХ після дії на нього сильнокислого середовища залозистого шлунка, що, можливо, пов'язано з біологічним оточенням білкової молекули.

Таблиця 2 – Протеолітична активність вмісту різних відділів шлунково-кишкового тракту курчат-бройлерів, мк-екв тирозину хв/мл ($M \pm m$, $n = 5$)

Група	Відділи шлунково-кишкового тракту		
	Воло	Залозистий шлунок	12-пала кишка (хімус)
I (OP)	0,091±0,005	0,197±0,021	0,315±0,016
II (OP+нат. ферм.)	0,203±0,020*	0,224±0,017	0,489±0,038*
III (OP+ іммоб. ферм.)	0,185±0,021*	0,293±0,026*	0,552±0,052*

Примітка: * – відхилення від показників контрольної групи статистично достовірні при $p < 0,05$.

Відображенням інтенсивності процесів метаболізму, що забезпечують ріст і розвиток бройлерів, є такий інтегральний показник як продуктивність. Згодовування курчатам іммобілізованого протосубтиліну ГЗХ позитивно впливало на приріст живої маси і сприяло зменшенню витрат корму. У порівнянні з контрольною групою, до кінця дослідження жива маса курчат, що отримували нативний фермент, була вища на 9,0 % ($p > 0,1$), а іммобілізований – на 16,0 % ($p < 0,05$). Витрати корму на 1 кг приросту в обох дослідних групах були однаковими (2,40 кг) і меншими, ніж у контрольній на 5,8 %.

Висновки. 1. Іммобілізація ферментного препарату протосубтилін ГЗХ здійснювалася адсорбційним методом на носії – цеоліті, в 0,1М фосфатному буферному розчині із значенням рН 7,0–7,4.

2. Оптимальне навантаження носія склало 22,5 мг білка на 1 г цеоліту, при цьому каталітична активність іммобілізованого ферменту дорівнювала 85,7 % від нативного ферменту.

3. Іммобілізований фермент виявив стабільність зі збереженням достатньої каталітичної активності в умовах, критичних для нативного ферменту.

4. Іммобілізований протосубтилін ГЗХ сприяв підвищенню протеолітичної активності травних ферментів шлунково-кишкового тракту бройлерів.

5. Використання стабілізованого протосубтиліну ГЗХ є перспективним для підвищення продуктивності сільськогосподарської птиці.

Перспективним напрямком подальших досліджень є створення іммобілізованих поліферментних композицій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кононенко С.И. Эффективный способ повышения продуктивности. Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2014. № 98. С. 759–768. URL:<http://ej.kubagro.ru/2014/04/pdf/33.pdf>.
2. Егоров Б. В., Кузьменко Ю. Я. Введення препаратів біологічно активних речовин до складу комбікормів для сільськогосподарської птиці : materiály X mezinárodní vědecko-praktická konference “Efektivní nástroj moderních věd – 2014” (Praha 27 dubna – 05 května 2014 r). Praha, 2014. P. 49–50.
3. Калоев Б. С., Псхациева З.В., Ибрагимов М. О. Эффективность использования ферментных препаратов при выращивании цыплят-бройлеров. Пермский аграрный вестник. Ветеринария и зоотехния. 2017. №3(19). С.129–135.
4. Тухбатов И. А. Эффективность применения комплексных кормовых добавок. Аграрный вестник Урала, 2016. № 8. С. 64–68.
5. Пономаренко Ю.А. Теория и практика применения ферментных препаратов Фекорд в кормлении птицы. V Казахстанский международный форум птицеводов (Астана, 26 августа 2016 г.). Астана, 2016. С. 78–80.
6. Калоев Б. С., Ибрагимов М. О. Приросты живой массы цыплят-бройлеров в зависимости от использования ферментных препаратов. Известия ФГБОУ ВО «ГГАУ». 2016. Т. 53, ч. 2. С. 88–93.
7. Ковалева Т.А., Макарова Е.Л. Стабилизация глюкоамилазы с помощью адсорбции на коллагене. Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы. Международная научно-методическая конференция (Воронеж 24–27 июня 2013). Воронеж, 2013. С. 55–58.
8. Robinson P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays in Biochemistry, 2015, V.59, P. 1–41. DOI: <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.
9. Тодосійчук Т. С. Встановлення технологічних режимів отримання іммобілізованого гідролітичного ферментного препарату. Вісник НТУ «ХПІ». Харків. 2015. № 52(1161). С. 122–126.
10. Ходыкина М.О., Першина Е.Д., Каздобин К.А., Трунова Е.К. Стабилизация нативного ферментного препарата на неорганических носителях каолине и аэросиле. Укр. хим. журнал. 2016. Т. 82, № 9, С. 57–63.
11. Brena B., González-Pombo P., Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey (Book Section). Methods Mol. Biol.: Immobilization of Enzymes and Cells / ed. Guisan J. New York: Humana Press, 2013. Vol. 1051. P. 15–31.
12. Moehlenbrock M. J., Minteer S. D. Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization. Methods Mol. Biol. / ed. Guisan J. New York: Humana Press, 2017. Vol. 1504. P. 1–9. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_1.
13. Сливкин А. И., Беленова А. С., Добрин Ю. В., Провоторова С. И. Изучение условий совместной иммобилизации трипсина и липазы на хитозане. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2015. №1. С. 119–123.
14. Enas N. Danial., Amal H. Hamza., Rasha H. Mahmoud. Characteristics of Immobilized Urease on Grafted Alginate Bead Systems. Braz. Arch. Biol. and Technol., 2015, Vol.58, n.2. P. 147–153. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201400204>.
15. Sewczyk T., Hoog Antink M., Maas M., Kroll S., Beutel S. Flow rate dependent continuous hydrolysis of protein isolates. AMB Express, 2018. Vol. 8 (1). Published online 2018 Feb 10. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13568-018-0548-9>.
16. Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M. A. General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. Catalysts 2018, 8 (2), 92. DOI: <http://doi:10.3390/catal8020092>.
17. Todosiichuk T. S., Zelena L. B., Klochko V. V. Multistage selection of soil actinomycete Streptomyces albus as a producer of antimicrobial substances. Emirates Journal of Food and Agriculture. 2015. Vol. 27. № 3. P. 250–257. DOI: <https://doi.org/10.9755/ejfa.v27i3.18267>.
18. Zdarta J., Klapiszewski L., Jedrzak A., Nowicki M., Moszynski D., Jesionowski T. Lipase B from Candida Antarctica Immobilized on a Silica-Lignin Matrix as a Stable and Reusable Biocatalytic System. Catalysts 2017, 7, 14. DOI: <http://doi:10.3390/catal7010014>.
19. Dwevedi Alka. Enzyme Immobilization : Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment. Cham: Springer International Publishing, 2016. 141p. URL: www.springer.com/gp/book/9783319414164.
20. Singh, Raushan Kumary., Manish Kumar Tiwari., Ranjitha Singh., Jung-Kul Lee. From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. International journal of molecular sciences. 2013. № 14(1). P. 1232–1277.
21. Talebi M., Vaezifar S., Jafari F., Fazilati M., Motamedi S. Stability Improvement of Immobilized α -amylase using Nano Pore Zeolite. Iran J Biotechnol., 2016. № 14(1). P. 33–38. DOI: <http://doi:10.15171/ijb.1261>.
22. Ключева М. В. Основные аспекты иммобилизации ферментов на примере липаз. Молодой ученый. 2014. №8. С. 320–325. URL: <https://moluch.ru/archive/67/11432/>
23. Мерзлов С. В. Згодовування перепелам іммобілізованого йоду, ферментів та хелату кобальту у складі комбікормів із дефіцитом фосфору. Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. Гжицького, 2013. Т. 15, № 1(4). С. 128–132.
24. ГОСТ 20264.2–88. Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности (с изменением №1). Действующий от 1989-01-01, дата редакции 01.02.2005. Изд. офиц. Москва: ИПК Издательство стандартов, 2005. 15 с.
25. Lowry O. H., Rosenbrougn N. I., Farr A. L., R. I. Randall. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, №1. P. 265–275.
26. Дрогалев А. А. Использование кремнийсодержащих препаратов в птицеводстве. Вестник Красноярского государственного университета. 2017. № 1 (124). С. 44–51.
27. Кердяшов Н. Н., Дарьин А. И. Применение местных нетрадиционных кормовых добавок в промышленном животноводстве. Пенза : РИО ПГСХА, 2016. 176 с.

REFERENCES

1. Kononenko, S. I. (2014). Jeffektivnyj sposob povyshenija produktivnosti [An effective way to increase productivity]. Politematicheskij setevoj jelektronnyj nauchnyj zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta [Polytechnical network electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University]. no. 98, pp. 759–768. Available at: <http://ej.kubagro.ru/2014/04/pdf/33.pdf>.
2. Egorov, B. V., Kuz'menko, Ju. Ja. (2014). Vvedennja preparativ biologichno aktivnyh rečovyn do skladu kombi-kormivdja sil'skogospodars'koi'ptyci [Introduction of preparations of biologically active substances into compound feed for agricultural poultry]. Materiály Xmezinárodní vědecko-praktická konference "Efektivní nástrojmoderních věd 2014" [Mat. X Int. Scien. and Pract. Conf. "Effective Tools of Modern Science – 2014"]. Praha, pp. 49–50.
3. Kaloev, B. S., Pshacieva, Z. V., Ibragimov, M. O. (2017). Jeffektivnost' ispol'zovanija fermentnyh preparatov pri vyrashhivanii cypłjat-brojlerov [Effect of using ferment preparation at chicken-broilers rearing]. Permskij agrarnyj vestnik [Perm Agrarian Journal]. Veterinarija i zootehnija Veterinyan dlivestock breeding]. no. 3 (19), pp.129–135.
4. Tukhbatov, I. A (2016). Jeffektivnost' primenenija kompleksnyh kormovyh dobavok [The effectiveness of the use of complex feed additives]. Agrarnyj vestnik Urala [Agrarian Bulletin of the Urals]. no. 8, pp. 64–68.
5. Ponomarenko, Yu. A. (2016). Teorija i praktika primenenija fermentnyh preparatov Fekord v kormlenii pticy [Theory and practice of the use of ferment preparations Fekord in feeding a bird]. V Kazahstanskij mezhdunarodnyj forum pticevodov (Astana, 26 avgusta 2016 g.) [V Kazahstan International Poultry Forum (Astana, August 26, 2016)]. Astana, pp. 78–80.
6. Kaloev, B.S., Ibragimov, M. O. (2016). Prirasty zhivoj massy cypłjat-brojlerov ot ispol'zovanija fermentny preparatov.[Broiler chickens live weight gain depending on using enzyme preparations]. Izvestija FGBOU VO «GGAU» [News FGBOU VO «Gorsky State Agrarian University»]. Vol. 53, no. 2,pp. 88–93.
7. Kovaleva, T.A, Makarova, E.L. (2013). Stabilizatsija gljukoamilazy s pomosch'ju adsorbtsii na kollagene [Stabilization of glucoamylase by adsorption on collagen]. Sovremennye problemy biofiziki slozhnyh sistem. Informatsionno- obrazovatel'nye protsessy : Mezhdunarodnaja nauchno-metodicheskaja konferentsija, 24-27 ijunja 2013, Voronezh. [Modern problems of biophysics of complex systems. Information and educational processes: International Scientific and Methodical Conference, June 24-27, 2013, Voronezh], pp. 55–58.
8. Robinson, P.K. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays in Biochemistry. 2015, Vol. 59, pp. 1–41. Available at: <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.
9. Todosijchuk, T.S. (2015). Vstanovlennja tehnologichnyh rezhymiv otrymannja immobilizovanogo gidrolitychnogo fermentnogo preparatu [Establishment of the technological modes of receiving the immobilized hydrolytic enzyme preparation]. Visnyk NTU "HPI", Har'kiv. [Bulletin of the NTU "KhPI"]. Kharkiv, no. 52(1161), pp. 122–126.
10. Hodykina, M.O., Pershina, E.D., Kazdobin, K.A, Trunova, E.K. (2016). Stabilizacija nativnogo fermentnogo preparata na neorganicheskikh nositeljah kaoline i ajerosile [Stabilization of a native enzyme preparation on inorganic carriers kaolin and aerosil]. Ukr. him. Zhurnal [Ukr. chem. Journal], Vol. 82, no 9, pp.57–63.
11. Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey [Book Section]. Methods Mol.Biol.: Immobilization of Enzymes and Cells / ed. Guisan J. New York: Humana Press, 2013. Vol. 1051, pp. 15–31.
12. Moehlenbrock, M. J., Minter, S. D. Introduction to the Field of Enzyme Immobilization and Stabilization. Methods Mol. Biol. / ed. Guisan J. New York: Humana Press, 2017. Vol. 1504, pp. 1–9. Available at: DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_1.
13. Slivkin, A.I., Belenova, A.S., Dobrina, Ju.V., Provotorova, S. I. (2015). Izuchenie uslovij sovместnoj immobilizacii tripsina i lipazy na hitozane [Studying of conditions immobilization of trypsin and lipase on the hitosane]. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Farmacija [Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology Pharmacy]. no. 1, pp. 119–123.
14. Enas, N. Danial., Amal, H. Hamza., Rasha, H. Mahmoud. Characteristic of Immobilized Urease on Grafted Alginate Bead Systems. Braz. Arch. biol. and technol. 2015, Vol.58, n.2. pp. 147–153. Available at: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201400204>.
15. Sewczyk, T., Hoog, Antink M., Maas, M., Kroll, S., Beutel, S. Flowratedependent continuous hydrolysis of protein isolates.AMB Express, 2018, Vol. 8 (1), Publishedonline 2018 Feb 10. Available at: <http://doi.org/10.1186/s13568-018-0548-9>.
16. Zdarta, J., Meyer, A.S., Jesionowski, T., Pinelo, M.A. General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts* 2018, 8 (2), 92. Available at: <http://doi:10.3390/catal8020092>.
17. Todosijchuk, T.S., Zelena, L.B., Klochko, V.V. Multistage selection of soil actinomycete *Streptomyces albus* as a producer of antimicrobial substances. Emirates Journal of Food and Agriculture. 2015, Vol. 27, no. 3, pp. 250–257. Available at: <https://doi.org/10.9755/ejfa.v27i3.18267>.
18. Zdarta, J., Klapiszewski, L., Jedrzak, A., Nowicki, M., Moszynski, D., Jesionowski, T. Lipase B from *Candida antarctica* Immobilized on a Silica-Lignin Matrix as a Stable and Reusable Biocatalytic System. *Catalysts* 2017, 7, 14. Available at: <http://doi 10.3390 / catal7010014>.
19. Dwevedi, Alka. Enzyme Immobilization : Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment. Cham:Springer International Publishing. 2016, 141p. Available at: www.springer.com/gp/book/9783319414164.
20. Singh, Raushan Kumar., Manish, Kumar Tiwari., Ranjitha, Singh., Jung-Kul, Lee. From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. International journal of molecular sciences. 2013, no. 14(1), pp. 1232–1277.
21. Talebi, M., Vaezifar, S., Jafary, F., Fazilati, M., Motamedi, S. Stability Improvement of Immobilized α -amylase using Nano Pore Zeolite. Iran J Biotechnol., 2016, no. 14(1), pp. 33–38. Available at: <http://doi: 10.15171/ijb.1261>.
22. Kljueva, M.V. (2014). Osnovnye aspekty immobilizacii fermentov na primere lipaz [The main aspects of immobilization of enzymes by the example of lipases]. Molodoy uchenyj [Young Scientist]. no. 8, pp. 320–325. Available at: <https://moluch.ru/archive/67/11432/>.

23. Merzlov, S.V., (2013). Zgodovuvannya perepelam immobilizovanogo jodu, fermentiv ta helatu kobal'tu u skladi kombikormiv iz deficytom fosforu [Feeding quail immobilized iodine enzymes and cobalt in chelate stock fodder with deficiency of phosphorus]. Naukovyj visnyk LNUVMBT im. G'zhyc'kogo [Scientific messenger of LNUVMBT named after S.Z. Gzhyskyj]. Vol. 15, no. 1(4), pp. 128–132.

24. GOST 20264.2–88. Preparaty fermentnye. Metody opredeleniya proteoliticheskoy aktivnosti [State Standart 20264.2–88. Enzyme preparations. Methods for determination of proteolytic activity]. Moscow, Standart inform Publ., 2005, 15 p.

25. Lowry, O.H., Rosenbroun, N.I., Farr, A.L., Randall, R. I. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, Vol. 193, no.1, pp. 265–275.

26. Drogalev, A.A. (2017). Ispol'zovanie kremnijsoderzhashhih preparatov v pticevodstve [The use of silicon-containing medicaments in poultry farming]. Vestnik Krasnojarskogo gosudarstvennogo universiteta [the Bulletin of KrasGAU]. no. 1 (124), pp. 44–51.

27. Kerdjashov, N.N., Dar'in, A.I. (2016). Primenenie mestnyh netradicionnyh kormovyh dobavok v promyshlennom zhivotnovodstve [The use of local non-traditional feed additives in industrial livestock]. Penza, RIO of PSPA, 176 p.

Стабілізація ферментного препарату протосубтилін Г3Х з целью використання його в птицеводстві Селезньова О. О., Цехмістренко С. І., Поліщук В. М., Поліщук С. А.

В статті представлені результати дослідження оптимальних умов для адсорбційної іммобілізації на цеоліте ферментного препарату протосубтилін Г3Х: 0,1М фосфатний буферний розчин з рН 7,0–7,4, температура 20–25 °С, ємкість носителя 22,5 мг/г, продовжителюність процесу 2 години. Установлено, що при таких умовах активність іммобілізованого ензиму відповідувала 85,7 % активності нативної форми. Іммобілізований фермент проявил стабільність з сохранием високої активності в умовах, критических для нативного ензиму. При рН-інактивации нативной и іммобілізованної форм протосубтиліна Г3Х потери каталитической активности модифицированного препарата были значительно меньше, чем у нативного, причем для іммобілізованного фермента наблюдали значительное расширение рН-профиля в кислой зоне. При рН 5,0 нативный фермент сохранил 20 % первоначальной активности и необратимо инактивировался в интервале рН 4,5–4,8, в то время как іммобілізованный при рН 4,0 сохранил 42 % активности. Определена эффективность использования стабилизированного препарата в опытахна цыплятах-бройлерах. Протеолитическая активность пищеварительных ферментов в разных отделах желудочно-кишечного тракта бройлеров опытной группы была достоверно выше, чем у цыплат контрольной группы. В частности, в химусе двенадцатиперстной кишки у цыплат группы, в рацион которой входил іммобілізованный препарат, увеличение протеолитической активности было выше на 12,8 % по сравнению с группой, получавшей нативный фермент. Скармливание цыплятам іммобілізованного протосубтиліна Г3Х положительно влияло на прирост живой массы и способствовало уменьшению затрат корма.

Ключевые слова: энзим, іммобілізация, нативный энзим, цеолит, адсорбция, протеолитическая активность, рН, буферный раствор.

Stabilization of enzyme preparation protosubtilin G3X for use it on poultry farming

Selezniova O., Tsekhmistrenko S., Polishchuk V., Polishchuk S.

Enzyme preparations witchused in animal breeding are unstable. Instability is due to a partial or complete inactivation of the enzymes in the gastrointestinal tract under the influence of a strongly acidic environment, inhibitors and proteases. Increasing the effectiveness of the use of exogenous enzyme preparations is possible by the creation of stabilized forms of biopreparations. To do this, use the principles and methods of engineering enzymology. The aim of the research is to determine the optimal conditions for the immobilization of the enzyme preparation of protosubtilin G3X (proteolytic spectrum of the action) by the adsorption method. Conduct a comparative evaluation of the properties of native and immobilized biocatalysts on the conditions in vitro and in vivo.

Proteolytic activity was determined by Anson's method. The amount of protein on the carrier was evaluated by reducing its concentration in the reaction mixture, measured with Lowry O.H. et al .. The activity of the immobilized enzyme was expressed as a percentage of the activity of the native enzyme. The pH solutions were measured on the potentiometer pH-340. For immobilization weused enzyme preparation of protosubtilin G3X with an activity of 70 units / g, as a carrier we used zeolite.

The immobilization procedure consisted of mixing the buffer solution of the enzyme with the carrier. During research and study of the influence of the ionic strength of the solution and pH on the adsorption process it was established that the catalytic activity of the obtained preparation falls in the buffers: phosphate, citrate, borate, acetate. Moreover, with an increase in the ionic strength of the solution, regardless of its composition, the enzyme activity of preparation was reduced. Optimal for immobilization was a 0.1 M phosphate buffer solution with pH in the range of 7.0–7.4. Protosubtilin G3X lost 80 % of the initial activity during immobilization in water.

When determining the capacity of a carrier, it is found that 1 g of zeolite adsorbs 29.8 mg of protein. The maximum specific activity of the enzyme (0.16 U / mg protein) is appeared at the optimum load of the carrier 22.5 mg protein per 1 g zeolite and corresponded to 85.7 % of the activity of the native protosubtilin G3X. Consequently, the optimal conditions for the immobilization of protosubtilin G3X on zeolite are: 0.1 M phosphate buffer solution with pH 7.0–7.4, temperature 20–25 °C, carrier capacity 22.5 mg / g, duration of the process 2 years.

In experiments in vitro studied the dependence of the catalytic activity of the pH value in the range of 1.5 to 8.0. After 1 hour of incubation in the buffer solutions, it was found that the optimal value of pH for both forms of preparations coincides (pH 7.2). With pH-inactivation of native and immobilized forms of protosubtilin G3X, the loss of catalytic activity of the modified preparation was significantly less than the native. Moreover, a significant expansion of the pH profile in the acidic zone was observed for the immobilized enzyme. If the native enzyme retained 20 % of the original activity at pH 5.0 and irreversibly inactivated at pH 4.5–4.8; the immobilized enzyme retained 42 % of the activity at pH 4.0.

We studied the proteolytic activity of digestive enzymes in different parts of the gastrointestinal tract of broilers: goitre (pH 4.5–5.8), glandular stomach (pH 3.6–4.7), duodenum (pH 5.7–6.2). The proteolytic activity of the contents of goiter in the groups of chickens which received native and immobilized protosubtilin G3X, was the same or higher, than in the control groups ($p < 0.01$). The value of the proteolytic activity of the contents of the glandular stomach in the group of broiler chickens which received the native enzyme sharply decreased almost to the level of the value in the control group. same value in the group which received the immobilized enzyme was higher by 30 % ($p < 0.05$). There was also an increase of the proteolytic activity in the chyme of the duodenum in the experimental groups of chicks ($p < 0.05$); however, the catalytic activity in the group which received the immobilized enzyme, was higher by 12.8 %.

It should be noted that in conditions *in vivo*, in contrast to similar conditions *in vitro*, was observed partial reactivation of the catalytic properties of the native protosubtilin G3X after exposure to the strongly acid medium of the glandular stomach, which is obviously related to the biological environment of the protein molecule.

To show the intensity of metabolic processes which provide growth and development of broiler, we use the integral indicator as productivity. Feeding of immobilized protosubtilin G3X to chickens positively influenced the weight gain and helped to reduce feed costs. At the end of the experiment, the weight of the chicks receiving the native enzyme was higher by 9.0 % ($p > 0.1$) and immobilized by 16.0 % ($p < 0.05$) compared to the control group. The feed costs for 1 kg of gain in both experimental groups were the same (2.40 kg) and less than in the control group by 5.8 %.

Keywords: enzyme, immobilization, native enzyme, zeolite, adsorption, proteolytic activity, pH, buffer solution.

Надійшла 19.11.2018 р.