

УДК 636.087.7

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СВОЙСТВ КОРМОВЫХ ДОБАВОК

¹Швыдков А.Н., ¹Мартышенко А.Е., ¹Ланцева Н.Н., ²Чебаков В.П., ¹Кобцева Л.А.

¹ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск,

e-mail: a-shvidkov@mail.ru;

²«ИП Чебаков», Бердск

В статье изложены результаты исследований по определению наличия ферментных свойств молочной кислоты кормовой добавки, на основе различных микроорганизмов пробиотиков. Установлено, что все исследуемые нами бактерии, в составе имеют высокую степень активности целлюлозы (ЦА) от 64,46 ед\мл в МКД-Р до 72,4 ед\мл, МКД-Л. МКД-S и МКД-B имеют одинаковую активность целлюлозы 66,7 ед\мл, активность протеазы (ПрА) обнаружена в МКД-Р – 7,5 ед\мл. Наименьшая ПрА содержится в МКД-Л, 1,0 ед\мл. МКД-B имеет значение ПрА 2,0 ед\мл, МКД-S 2,5 ед\мл. Активность липазы (ЛА) определена в МКД-Л – 1,4 ед\мл и в МКД-B – 12,6 ед\мл. В МКД-S и МКД-Р фермент липаза не обнаружен. Амилотическая активность (АА) обнаружена в МКД-B – 11,2 ед\мл и в МКД-Р – 9,4 ед\мл.

Ключевые слова: образцы, ферменты, молочнокислая кормовая добавка, пробиотик, ферментативная активность, монокультуры микроорганизмов, активность липазы, протеолитическая активность, целлюлолитическая активность, липолитическая активность

THE STUDY OF THE ENZYMATIC PROPERTIES OF FEED ADDITIVES

¹Shvydkov A.N., ¹Martyshenko A.E., ¹Lantseva N.N., ²Chebakov V.P., ¹Kobtseva L.A.

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Novosibirsk State Agrarian University» (Novosibirsk SAU), Novosibirsk, *e-mail: a-shvidkov@mail.ru;*

²«IP Chebakov», Berdsk

The article presents the results of the research on the determination of enzyme properties of acido-lactic feed additives, on the basis of various monocultures of microorganisms of probiotan. It was found that all the tested bacteria has a high degree of cellulase of activity (CA) from 64,46 ed/ml in MCD-P to 72,4 ed/ml, MCD-L. MCD-S and MCD-B have the same cellulase activity 66,7 ed/ml, protease activity (PRA) was found in MCD-P – 7,5 ed/ml Least PRA contained in MCD-L, 1.0 u/ml MCD-B has the value of Human 2,0 ed/ml, MCD-2.5 u S/ml Activity of lipase (LA defined in MCD-L – 1.4 units/ml and MCD-B – 12,6 ed/ml MCD-S and MCD-P enzyme lipase not found. Amylolytic enzyme activity (AA) found in the CCM-B – 11,2 ed/ml and MCD-P – 9,4 ed/ml.

Keywords: samples, enzymes, lactic acid feed additive, probiotic, fermentativnaya activity, monocultures of microorganisms, lipase activity, proteolytic activity, cellulolytic activity, lipolytic activity

В настоящее время, во многих развитых странах мира, здоровье человека признается главным богатством страны. Здоровье человека определяет не только его работоспособность, качество и продолжительность жизни, но и пользу для государства.

Современная трактовка понятия «биологические ресурсы» предусматривает сочетание задач сохранения природного флористического фаунистического и ландшафтного разнообразия как основы поддержания глобальных экологических процессов и расширения биоресурсной базы биологических объектов за счет перехода от экстенсивного к интенсивному типу ресурсопользования. Основой этого должна стать замена изъятия биологической продукции из природных популяций разработкой методов создания высокопродуктивных фито-, зоо-, аквакультур ресурсных видов организмов, а так же развитием биотехнологий, оптимизирующих управление ресурсами природных и искусственно созданных биосистем [1, 2].

Ферменты – вещества, ускоряющие химические реакции в живых системах. Первый высокоочищенный фермент уреазы в 1926 году получил ДЖ. Самнер. В течение последующих 10 лет было получено еще несколько ферментов. Ферменты имеют белковую природу, это белковые молекулы или молекулы РНК. Ферменты преобразуют одни вещества в другие, субстраты в продукты. До 2012 года в мире было описано более 5000 ферментов [3, 4, 5].

В кормлении животных и птиц рассматривается роль пищевых ферментов, расщепляющих крупные молекулы корма на мономеры для последующего усвоения в организме. Традиционно различают четыре группы ферментов: протеазы, липазы, целлюлазы, и амилазы.

Протеазы или протеолитические ферменты действуют на зерновые белки и продукты гидролиза белков. Липазы или липолитические ферменты расщепляют жиры на глицерин и жирные кислоты. Амилотические ферменты (альфаамилаза и бетаамила-

за) воздействуют на крахмал, превращая его в декстрины, с образованием мальтозы [6].

С момента первых публикаций Ф. Кликера и Е. Фолуэлла (1926), об улучшении роста цыплят и повышении яйценоскости кур за счет применения в комбикормах протеина, накоплен большой отечественный и зарубежный опыт по применению ферментов в кормлении птицы.

Однако, система пищеварительных ферментов птицы, вполне справляется с гидролизом основных компонентов корма (белков, жиров, углеводов). Но эффективность собственной ферментной системы снижается при содержании в корме трудногидролизуемых компонентов, а так же при болезнях, некачественных компонентах корма и т.д. (В.И. Фисинин, Т.М. Околелова, И.А. Егоров, В.А. Гейнель, 2009). Большинство промышленных ферментных комплексов отечественного и импортного производства являются продуктом биотехнологий эффективных микроорганизмов, способных вырабатывать те или иные ферменты. Доступность питательных веществ корма под действием таких ферментов действительно увеличивается Т.М. Околелова, А.В. Кулаков, С.А. Молоскин (2001); Е.А. Кончакова (2004); Т.М. Околелова (2000); В.И. Фисинин, И.А. Егоров, Т.М. Околелова, Ш.А. Имангулов (2004); П.Н. Тищенко (1995); В.И. Фисинин, Т.М. Околелова, Д.А. Догадаев, Л.И. Криворучко (2005); В.И. Фисинин, Т.М. Околелова, О.А. Провирикова, Е.Н. Григорьева (2007).

Но при этом страдает видовое разнообразие микроорганизмов кишечника, лишившихся традиционных питательных субстратов корма.

В ООО «Птицефабрика Бердская» Новосибирской области внедрена «Технология производства функциональных экопродуктов птицеводства» [7].

Согласно технологии, вся промышленная птица не получает лечебные препараты, ферментные комплексы, антибактериальные и противопаразитарные препараты, рыбную муку и кукурузный глютен. Основой рациона являются пшеница, продукты переработки сои и подсолнечника. К основному рациону добавляется молочнокислая кормовая добавка (далее – МКД), основой которой могут быть различные микроорганизмы пробиотиков [8, 9, 10, 11].

В научной литературе исследователи часто объясняют полученный от применения пробиотиков эффект, применяя общепринятые свойства пробиотиков, в том числе,

наличие в их продуктах жизнедеятельности ферментов. Однако отсутствуют данные об активности ферментных групп как в МКД, так и в сравнении с различными формообразующими микроорганизмами в их составе.

Цель работы – определить наличие ферментных свойств МКД, на основе различных монокультур микроорганизмов пробиотиков.

Материалы и методы исследований

Исследования по определению ферментативной активности МКД на основе различных бактерий проводились в четыре этапа. Для исследования были отобраны образцы МКД на основе монокультур-МКД-B (*Bifidobacter bifidum longum*), МКД-S (*Streptococcus termophilus*), МКД-P (*Propionobacterium acidipropionicum*), МКД-L (*Lactobacillus acidophilus*).

На первом этапе (по ГОСТ 20264.4-89 «Препараты ферментные. Метод определения амилаолитической активности») методом Ансона, во всех образцах МКД, определялась суммарная амилаолитическая активность. Метод Ансона основан на гидролизе крахмала ферментно-амилолитическим комплексом до декстринов различной молекулярной массы.

На втором этапе (по ГОСТ 20264.2-88 «Препараты ферментные. Методы определения протеолитической активности») определялась суммарная протеолитическая активность в исследуемых образцах. Метод основан на гидролизе белка казеината натрия ферментным комплексом, при pH–7,2. Для определения ПА, нейтральной протеазы, от 0–10 ед/мл, проверены минимальные разведения. Кислая протеаза, определялась при pH–5,5, при которой проходит гидролиз белка.

На третьем этапе (по ТУ9291-008-13684916-05) во всех представленных образцах МКД определялась общая целлюлозолитическая активность. Методика определения целлюлазы основана на определении восстанавливающих сахаров в результате гидролиза целлюлазы хроматографической бумаги под действием фермента. Метод рекомендован международной комиссией ИЮПАК по биотехнологии в качестве основного теста на целлюлазную активность. За единицу эффективности целлюлазы принимают такое количество фермента, которое при действии на хроматографическую бумагу при 50°C и pH 4,8 образует 1 ммоль восстанавливающих сахаров в 1 мин. Как правило, активность выражается в единицах на миллилитр.

Последним *четвертым этапом* определения ферментативной активности МКД было определение активности липазы. Метод определения липазы по методике Скермана, основан на определении титрования щелочью жирных кислот, образовавшихся под действием липазы при использовании в качестве субстрата оливкового масла. При определении липазной активности использовалась реакционная смесь, состоящая из 6,5 мл 1\15 М фосфатно-цитратного буфера, 2,5 мл эмульсии оливкового масла в 1%-ном растворе поливинилового спирта в соотношении 2:3 и 1 мл фильтрата культуральной жидкости.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследования МКД на основе различных микроорганизмов пробиотиков, пока-

зали, что все исследуемые МКД, содержат одну или несколько групп ферментов. Так МКД-В, показала наличие всех исследуемых групп ферментов. МКД-Р содержит в своем составе три группы ферментов: амилолитические, протеолитические, целлюлозалитические. В МКД-Л обнаружены так же три группы ферментов: протеолитические, целлюлозалитические

и липолитические, слабо выражена амилолитическая группа. МКД-S имеет в своем составе две группы ферментов: протеолитическую и целлюлозалитическую, амилолитическая и липолитическая активность выражена слабо.

Результаты исследования ферментативной активности МКД, представлены в таблице.

Ферментативная активность МКД

Проба МКД	Амилолитическая активность (АА), ед\мл	Протеолитическая активность (ПрА), ед\мл	Целлюлозолитическая активность (ЦлА), ед\мл	Липолитическая активность, (ЛА), ед\мл
МКД-L	----	1,0	72,4	1,4
МКД-S	----	2,5	66,7	----
МКД-В	11,2	2,0	66,7	12,6
МКД-Р	9,4	7,5	64,46	----

Анализируя данные, полученные в результате исследования ферментативной активности МКД, можно отметить, что все исследуемые монокультуры МКД имеют высокую степень активности целлюлозы (ЦА) от 64,46 ед\мл в МКД-Р до 72,4 ед\мл, МКД-L. МКД-S и МКД-В имеют одинаковую активность целлюлозы 66,7 ед\мл.

Все исследуемые нами МКД содержат, кислую протеазу, в которой гидролиз белка осуществляется при рН-5,5. Наибольшая активность протеазы (ПрА) обнаружена

в МКД-Р – 7,5 ед\мл. Наименьшая ПрА содержится в МКД-L, 1,0 ед\мл. МКД-В имеет значение ПрА 2,0 ед\мл, МКД-S 2,5 ед\мл. Активность липазы (ЛА) определена в МКД-L – 1,4 ед\мл и в МКД-В – 12,6 ед\мл. В МКД-S и МКД-Р фермент липаза не обнаружен. Амилолитическая активность (АА) обнаружена в МКД-В – 11,2 ед\мл и в МКД-П- 9,4 ед\мл.

На рис. 1, 2, 3, 4 представлено графическое представление значения ферментативной активности МКД.

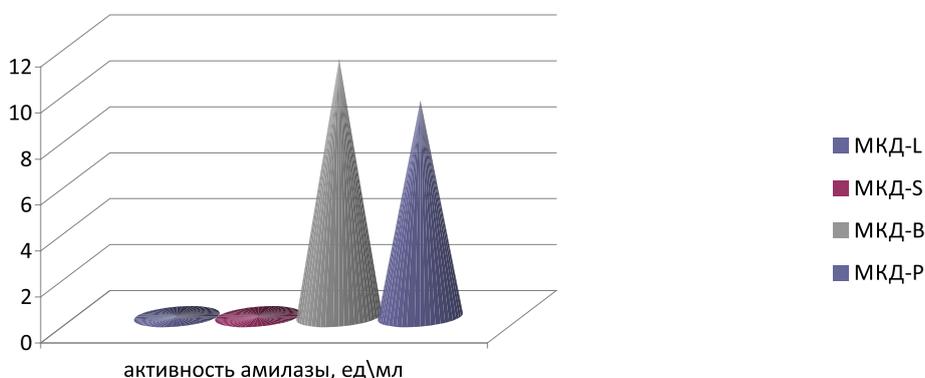


Рис. 1. Активность амилазы МКД

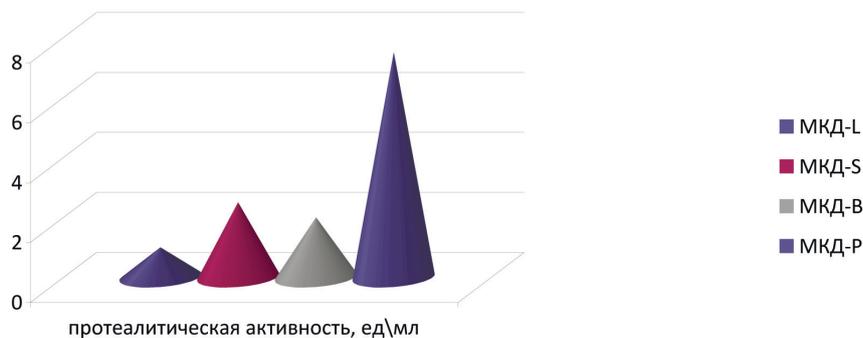


Рис. 2. Протеолитическая активность МКД

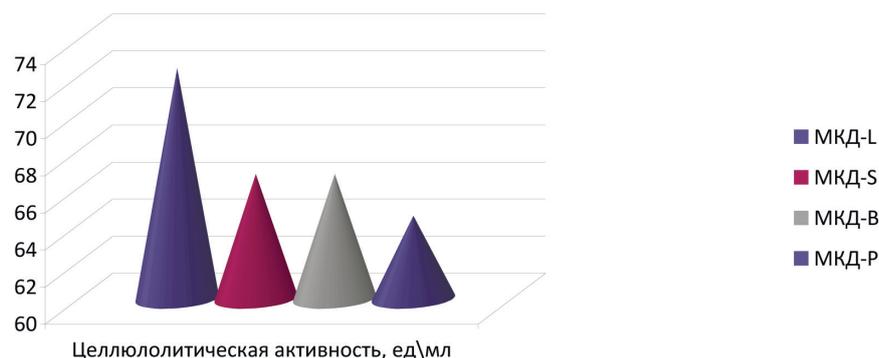


Рис. 3. Целлюлолитическая активность МКД

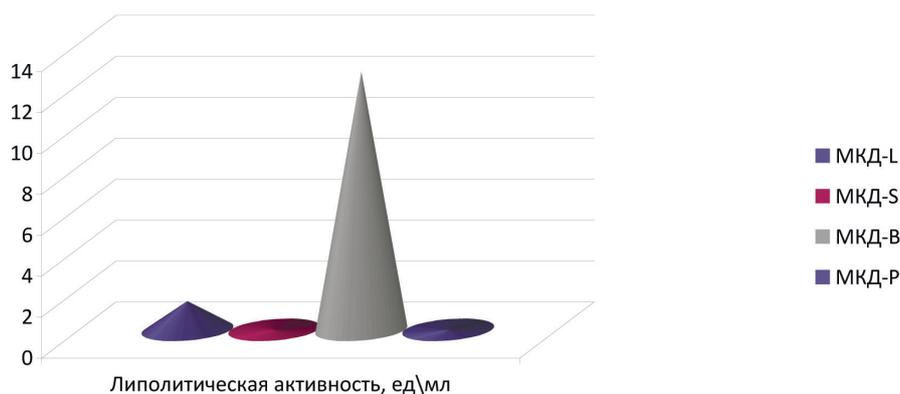


Рис. 4. Липолитическая активность МКД

Данные, полученные в результате исследования ферментативной активности кормовой добавки МКД, на основе различных бактерий, согласуются с литературными о том, что бактерии пробиотики, обладают ферментативной активностью. Наши исследования выявили лидирующие ферментные свойства бифидобактерий в составе МКД, по сравнению с другими исследуемыми микроорганизмами. Различные штаммы бифидобактерий составляют, по некоторым данным, до 90% представителей нормофлоры кишечника птицы. Бифидобактерии находятся во всех отделах кишечника. Синтезируемые ими все обнаруженные ферментные группы, таким образом, участвуют во всех ферментных процессах при переработке кормов в желудочно-кишечном тракте.

По мнению Хавкина А.И. бифидобактерии принимают активное участие в процессах энзиматического пререваривания кормов, усиливая гидролиз протеинов, сбраживают углеводы, омыляют жиры, растворяют клетчатку [18].

Все исследуемые нами бактерии, в составе МКД показали определенную степень ферментативной активности. Полученные

данные свидетельствуют о специфичности уровня и спектра производимых ферментных групп, в зависимости от принадлежности микроорганизмов к определенным видам и условиям жизнедеятельности. Эти данные, в совокупности с остальными характеристиками должны учитываться при разработке различных рекомендаций по применению тех или иных видов пробиотических кормовых добавок.

Список литературы

- Егоров И. Применение пробиотиков для цыплят бройлеров / И. Егоров, П. Паньков, С. Карпушина, В. Лившиц // Комбикормовая промышленность. – 1996. – № 4. – С. 11–18.
- Павлов Д.С. Биологические ресурсы России и основные направления фундаментальных исследований / Д.С. Павлов, Б.Р. Стриганова // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. Сборник научных статей. Москва: Товарищество научных статей КМК. – 2005. – С. 2–4.
- Егоров И. Ферменты фирмы БАСФ помогают птицеводам / И. Егоров, Ш. Имангулов, Б. Авдонин, А. Кузнецов // Комбикорма. – 2002. – № 7. – С. 39–40.
- Егоров И. Ферментированная кормовая добавка / И. Егоров, П. Паньков, Б. Розанов, Т. Егорова // Комбикорма. – 2004. – № 1. – С. 60–61.
- Егоров И. Эффективность пробиотика Терацид / И. Егоров, Ш. Имангулов, К. Харламов, П. Паньков и др. // Птицеводство. – 2007. – № 6. – С. 25–56.
- Околелова Т.М. Корма и ферменты / Т.М. Околелова, А.В. Кулаков, С.А. Молоскин, Д.М. Грачев // Сергиев Посад. – 2001. – С. 68–114.

7. Мотовилов К.Я. Технология производства функциональных экопродуктов птицеводства / К.Я. Мотовилов, О.К. Мотовилов, А.Н. Швыдков, Н.Н. Ланцева и др. // Методические рекомендации. ГНУ СибНИИП. Новосибирск. – 2012. – С. 19–24.
8. Ланцева Н.Н. Реализация «Кодекс Алиментариус» в птицеводстве / А.Н. Швыдков, Л.А. Кобцева // Материалы Международной научной конференции, Минск. – 19–22 ноября 2013. – С. 163–167.
9. Чебаков В.П. Использование молочнокислой кормовой добавки с пробиотиками в рационах сельскохозяйственных животных / В.П. Чебаков, А.Н. Швыдков, Г.В. Богатырева // Методические рекомендации РАСХН СО СибНИИПТИП, Новосибирск. – 2005. – С. 5–13.
10. Швыдков А.Н. Использование пробиотиков в бройлерном производстве / А.Н. Швыдков, Л.А. Кобцева, Р.Ю. Килин, Т.В. Усова, Н.Н. Ланцева // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. – 2013. – №2. – С. 40–47.
11. Швыдков А.Н. Эффективность использования пробиотиков в бройлерном птицеводстве / А.Н. Швыдков, Р.Ю. Килин, Т.В. Усова, Л.А. Кобцева, Н.Н. Ланцева // Главный зоотехник. – 2013. – №5. – С. 22–29.
12. Ленкова Т.Н. Мультиэнзимные композиции в комбикормах, содержащих нетрадиционные компоненты / Т.Н. Ленкова // Птица и птицепродукты. – 2007. – №2. – С. 46–49.
13. Околелова Т. Корма и биологически активные добавки для птицы / Т. Околелова, С. Румянцев, А. Кулаков, А. Морозов // М.: Колос, – 1999. – С. 32–53.
14. Околелова Т. Отечественные энзимы – птицеводству / Т. Околелова, С. Румянцев, А. Морозов, Т. Кузнецова // Животноводство России. – 2000. – №8. – С. 38–41.
15. Околелова Т. Новые возможности использования ржи в комбикормах для бройлеров / Т. Околелова, Л. Криворучко, Д. Бадаева, С. Молоскин // Комбикорма. – 2001. – № 1. – С. 51–52.
16. Околелова Т. Актуальные проблемы применения биологически активных веществ и производства премиксов / Т.М. Околелова, А.В. Кулаков, С.А. Молоскин, Д.М. Грачев // Сергиев Посад. – 2002. – С. 105–120.
17. Хавкин А.И. Микробиоценоз кишечника и иммунитет / А.И. Хавкин // РМЖ. – 2003. – Т.11. – № 3. – С. 121–122.
18. Stackebrandt E, Goebel B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology // *Int. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 44 – P. 846–847.
19. Lan P.T.N. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes / P.T.N. Lan et al. // *Microbiol. Immunol.* – 2004 – 48(12). – P. 917–929.