

Винахід належить до галузей сільського господарства, зокрема, до тваринництва і може бути використаний для підвищення ефективності дії екзогенних гідролітичних ферментів, які включають до складу раціонів сільськогосподарських тварин і птиці.

Екзогенні ферментні препарати сприяють підвищенню доступності поживних речовин корму, інтенсифікують і поглиблюють гідролітичні процеси в шлунково-кишковому тракті, підвищують коефіцієнт дії комбікорму і продуктивність. Проте, ферментні препарати, відзначаються нестабільністю дії внаслідок часткової або повної їх інактивації в шлунково-кишковому тракті під дією надто кислого середовища, інгібіторів, протеаз. Крім того каталітична активність ферментів з протеазною активністю (протосубтилін Г20х) зменшується при зберіганні протягом 1 місяця на 20 - 30%.

Найбільш близьким за технічною сутністю є спосіб одержання ферментних препаратів, згідно з яким здійснюють іммобілізацію ферментів протягом 1 - 24 год при рН 3,4 - 5,5 і температурі 15 - 55°C на носіях, які готують з використанням багатокремнієвих цеолітів високої кислотності та оксиду алюмінію з об'ємом пор  $\geq 0,4 \text{ см}^3$ .

Для іммобілізації кожного ферменту необхідні точні умови (середовище, рН, температура, час, співвідношення інгредієнтів), без витримання яких неможливо зберегти каталітичну активність препаратів, крім того, оксид алюмінію, який входить до складу носія, не використовується в годівлі сільськогосподарських тварин і птиці.

Задачею винаходу є розробка способу одержання препарату з протеолітичною активністю для годівлі сільськогосподарських тварин і птиці, в якому зміна носія дозволила б перевести фермент в нерозчинний стан, що запобігло б денатураційним перебудовам білкової макромолекули і сприяло б підвищенню стабільності препарату при тривалому зберіганні та під час знаходження в шлунково-кишковому тракті.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі одержання препарату з претеолітичною активністю шляхом сорбції ферменту з протеолітичною активністю на мінеральному носії, згідно з винаходом, як мінеральний носій використовують цеоліт, як фермент - протосубтилін Г20х, а сорбцію проводять в фосфатному буферному розчині при рН 6,8 - 7,2 шляхом перемішування носія і ферменту протягом 1,5 - 2,5 годин при кімнатній температурі.

При цьому 1г одержаного препарату іммобілізованого ферменту містить 60од. протеолітичної активності, що складає 86% від активності розчинного ферменту.

Ефективність дії іммобілізованого протосубтиліну Г20х перевіряли в пробіркових дослідах і в досліді на курчатах-бройлерах. Встановлено, що згодовування стабілізованого таким чином ферменту з комбікормом стимулювало приріст живої маси, сприяло зниженню витрат корму на одиницю продукції. Технічне розв'язання поставлених завдань пояснюється наступними прикладами:

Приклад 1. Пробірковий дослід. Залежність каталітичної активності нативного і іммобілізованого протосубтиліну Г20х від рН середовища.

Іммобілізацію протосубтиліну Г20х здійснювали при постійному перемішуванні 1г цеоліту 160мг ферменту в 10мл фосфатного буферу рН 7,2 протягом двох годин при кімнатній температурі. Одержаний препарат іммобілізованого протосубтиліну Г20х відділяли фільтруванням.

Каталітичну активність протосубтиліну Г20х визначали за протеолітичною активністю модифікованим методом Аксона за ГОСТ 20264 2 - 74. Кількість білка на носії визначали за зниженням його концентрації в реакційній суміші. Значення активності іммобілізованого ферменту виражали в відсотках від активності нативного ферменту, Величину рН буферних розчинів визначали з допомогою рН-метра.

З метою відтворення рН середовища в діапазоні, близькому до фізіологічного, проводили порівняльну оцінку поведінки нативного і іммобілізованого протосубтиліну Г20х в інтервалі від 1,5 до 8,0 з використанням цитратно-фосфатних буферних розчинів при 30°C. Після інкубації ферментів в розчинах з різними значеннями рН протягом двох годин визначали їх активність.

На графіку (фіг.) наведені дані рН-залежності каталітичної активності нативного і іммобілізованого 2 протосубтиліну Г20х. Іммобілізація ферменту не призвела до зміни рН-оптимума; для обох форм ферменту він дорівнює 7,2. Іммобілізований протосубтилін Г20х виявив значну стабільність в кислому середовищі. При цьому спостерігали значне розширення рН-профілю по відношенню до нативного ферменту. Так, при рН 4 величина активності іммобілізованого ферменту склала 42%, в той час як нативний фермент інактивувався і відновити його каталітичні властивості при оптимальному значенні рН (7,2) не було можливо.

Приклад 2. Вивчення впливу іммобілізованого протосубтиліну Г20х на продуктивність курчат-бройлерів.

В досліді за принципом аналогів було сформовано 2 групи - контрольна і дослідна добових курчат по 50 голів в кожній групі. Бройлери утримувались в кліткових батареях. Годівля відповідала вимогам технології годівлі курчат-бройлерів. Термін вирощування - 56 діб. В період вирощування враховували витрату корму, періодично проводили контрольні зважування для визначення динаміки росту. В досліді як добавку використовували цеоліт тонкого помелу сорту А Сокириницького родовища Закарпатської області і ферментний препарат протосубтилін Г20х Лоджинського заводу ферментних препаратів.

Курчата контрольної групи одержували раціон, в якому містилось 5,6од. протеолітичної активності (протосубтилін Г20х) і 2,5г цеоліту на 1кг корму. Раціон курчат дослідної групи містив таку ж кількість іммобілізованого на цеоліті протосубтиліну Г20х.

Комплексні дослідження, які включали вивчення біохімічних і зоотехнічних параметрів, проводили в 8-тижневому віці. Результати дослідження, наведені в таблиці, дозволяють зробити висновок про те, що адсорбційна іммобілізація протосубтиліну Г20х справляє позитивний вплив на продуктивність курчат і знижує витрати корму на одиницю продукції.

Встановлено, що вміст загального білка в хімусі дванадцятипалої кишки курчат, які одержали іммобілізований протосубтилін Г20х, зменшився, що корелює із збільшенням протеолітичної активності в цій групі і свідчить про підвищення швидкості гідролізу білків корму та посилення всмоктування продуктів розщеплення. Згодовування нативних ферментів суттєво не вплинуло на рівень білка у вмісті кишечника.

Таким чином, іммобілізація протосубтиліну Г20х на цеоліті дозволяє підвищити ефективність дії екзогенного фермента, одержати каталізатор пролонгованої дії, що здійснює свою каталітичну функцію в шлунково-кишковому тракті без істотної втрати активності.

Економічна ефективність запропонованого способу обумовлена зниженням витрат корму на 1кг приросту живої маси і підвищенням продуктивності. Перевагою даного способу є також використання дешевого носія - цеоліту, який застосовується як кормова добавка і природні запаси якого в Україні становлять мільйони тон.

Таблиця

**Зоотехнічні та біологічні показники  
курчат-бройлерів  $M \pm t$  (n=5-50)**

Показники	Групи		Р
	контрольна	дослідна	
Жива маса на кінець досліду, г	1471,5±54,40	1566,0±61,77	< 0,05
Витрати корму на 1 кг приросту, кг	2,44	2,32	
<b>Шлунково-кишковий тракт</b>			
Білок, мг %	3423±247,1	2687±219,1	< 0,05
Протеолітична активність, мк-екв тір/хв.	0,489±0,038	0,552±0,052	< 0,05
Активність лужної фосфатази, мг % Р	1817,2±51,11	2180,0±113,50	< 0,05
Активність амінотрансфераз, мкМ пірувату			
А с Т	284±12,3	305±9,7	< 0,05
А л Т	49±3,8	55±2,5	> 0,05
<b>Печінка</b>			
Нуклеїнові кислоти, мг % Р			
Д Н К	4,9±0,36	4,6±0,54	> 0,05
Р Н К	27,1±1,01	31,9±1,17	< 0,05
Глікоген, мг % Р	1881±43,7	2032±54,6	< 0,05

$A, \%$

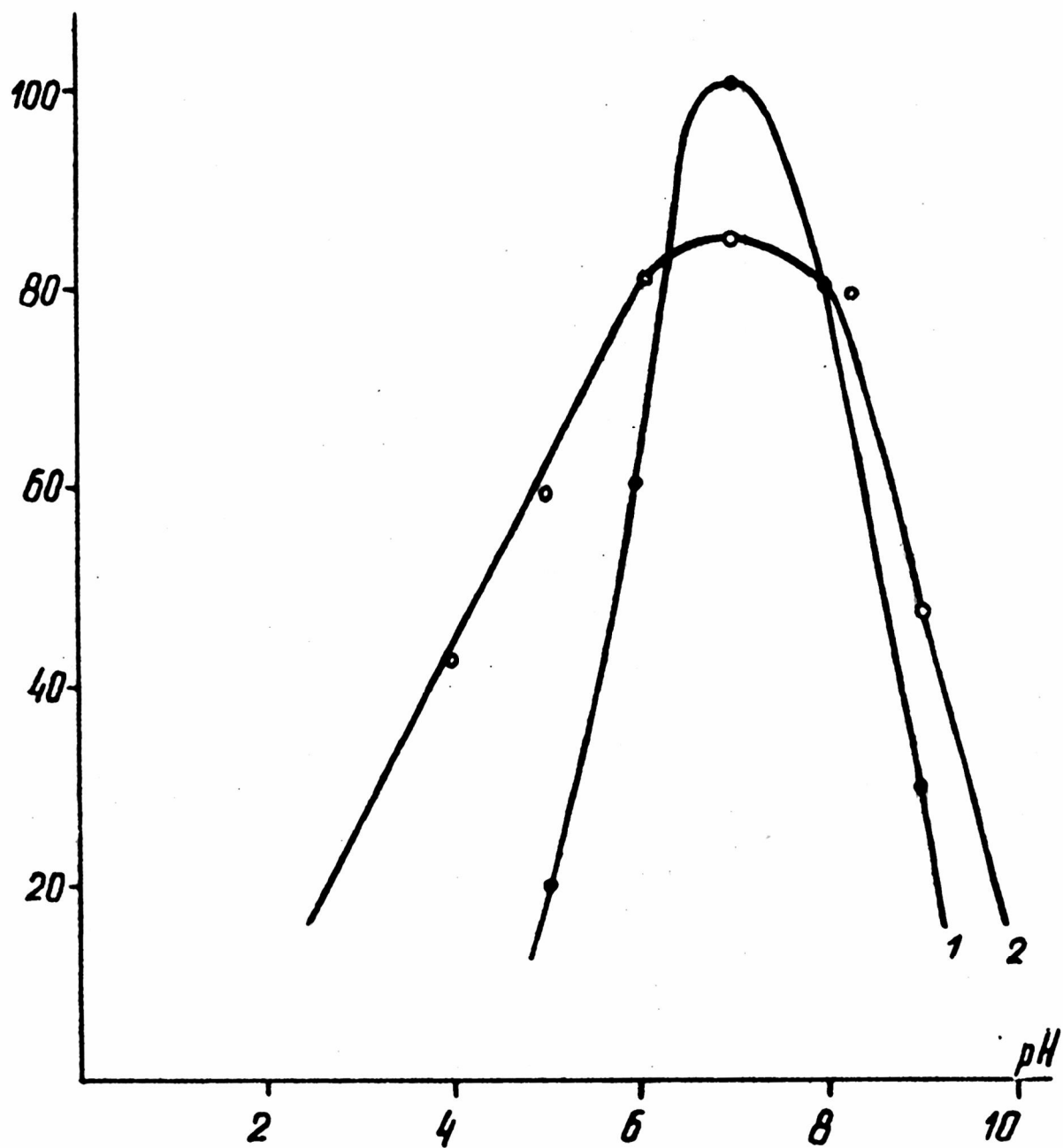


Fig.