

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ В ПТИЦЕВОДСТВЕ

А.О. Корягина¹, Д.С. Бульмакова¹, А.Д. Сулейманова¹, Н.Л. Рудакова¹,
А.М. Марданова¹, С.Ю. Смоленцев², М.Р. Шарипова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Марийский государственный университет, г. Йошкар-Ола, 424000, Россия

Аннотация

Проведен анализ потенциала микробных ферментов гистидиновой кислой фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 и субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* для использования в качестве кормовых добавок. При исследовании активности протеиназы *B. pumilus* при значениях pH, соответствующих различным отделам пищеварительного тракта кур, фермент оставался в активном состоянии. В присутствии желчи в концентрациях 0.01–0.25% и 0.01–5% фитаза и протеиназа сохраняли более 50% активности. Фитаза *Pantoea* sp. 3.5.1 эффективно гидролизовала фитат, находящийся в составе кормов для кур. Исследования влияния микробных ферментов на продуктивность, перевариваемость и усвояемость питательных веществ цыплятами-бройлерами показали увеличение абсолютного прироста птицы, а также повышение усвоения кальция, фосфора и азота. Полученные данные позволяют сделать заключение о перспективах применения фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 и субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* в качестве добавок в птицеводстве.

Ключевые слова: фитаза, фитат, протеиназа, кормовые добавки, микроорганизмы

Введение

Антимикробные препараты широко используются для профилактики заболеваний домашней птицы и улучшения производственных показателей сельскохозяйственных животных [1]. Однако глобальные тенденции в производстве птицы направлены на снижение использования антибиотиков из-за их накопления в молоке, яйцах и мясе птиц. Регулярное потребление таких продуктов приводит к появлению устойчивых форм микроорганизмов. Использование бактериальных ферментов в качестве альтернативы антимикробным препаратам привлекает все больше внимания. Ферменты играют важную роль в процессе переваривания корма и определяют такой важный показатель рациона, как усвояемость питательных пищевых веществ и, как следствие, способствуют снижению стоимости рациона. Наиболее распространенным ферментом в качестве кормовой добавки является фитаза, используемая для увеличения гидролиза фитата, входящего в состав зерновых кормов, и, таким образом, для высвобождения фосфора, что уменьшает необходимость добавления в рацион дорогостоящих неорганических источников фосфора [2]. Добавление фитазы в рацион для бройлеров

повышает выход мяса, уменьшает конверсию корма и улучшает прирост массы тела из-за восстановления баланса между минералами, уменьшения эндогенных потерь, вызванных фитатом [3].

Второй распространенной группой ферментов, применяющихся в качестве пищевых добавок, являются протеазы. Протеазы катализируют гидролиз белков. Считается, что экзогенные протеазы не только дополняют пищеварительные ферменты животных, такие как пепсин и трипсин, но и уничтожают антипитательные вещества, такие как лектины и ингибиторы трипсина [4]. Многочисленные исследования показали, что добавка протеаз в корма сельскохозяйственной птицы имеет различные эффекты, включая улучшение показателей роста и усвояемости аминокислот [5, 6]. Кроме того, экзогенные протеазы служат профилактическим средством, обеспечивая снижение уровня непереваренного белка, который является фактором колонизации кишечника патогенными бактериями [7, 8]. Мы оценивали эффект добавления бактериальных протеазы и фитазы в корма цыплят-бройлеров на показатели роста и усвояемость питательных веществ.

Целью настоящего исследования – оценить в опытах *in vitro* и *in vivo* потенциальную возможность использования ферментов (субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* и фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1) в качестве кормовых добавок цыплятам-бройлерам.

1. Материалы и методы исследования

1.1. Препараты микробных ферментов. Для работы использовали препараты бактериальной фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 (AgpP), продуцируемой рекомбинантным штаммом дрожжей *Pichia pastoris* pPINK-HC/AgpP [9], и субтилизиноподобной протеиназы *B. pumilus* (AprBp), синтезируемой рекомбинантным штаммом *B. subtilis* pCS9 [10].

1.2. Определение ферментативной активности фитазы и протеиназы. Активность фитазы определяли по количеству высвободившегося фосфора при гидролизе субстрата фитата натрия (Sigma Aldrich, США) по методу Грейнера [11]. За единицу активности фитазы принимали количество фермента, которое необходимо для расщепления фитата натрия с образованием 1 мкМ неорганического фосфата за 1 мин.

Активность протеазы определяли по гидролизу азоказеина (Sigma, США) по методу, описанному в работе [12]. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин.

1.3. Изучение стабильности протеиназы в средах, показатели которых приближены к условиям в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) кур. В экспериментах использовали буферные системы со значениями pH, соответствующими различным отделам ЖКТ кур: зоб – 0.1 М ацетат натрия (pH 5.5), желудок – 0.1 М глицин-HCl (pH 3.0), тонкий кишечник – 0.1 М трис-ацетат (pH 6.5), толстый кишечник – 0.1 М трис-HCl (pH 8.0). Раствор фермента переносили последовательно из одного буфера в другой путем разведения и инкубировали при 40 °С

по следующей схеме: рН 5.5 – 50 мин, рН 2.9 – 90 мин, рН 6.5 – 30 мин, рН 8 – 70 мин. Каждые 10 мин проводили отбор проб и измеряли активность ферментов по стандартной методике.

1.4. Влияние желчи на стабильность фитазы и протеиназы. В настоящей работе была использована желчь, полученная от цыплят-бройлеров кросса Cobb-500 10-дневного возраста. Раствор фермента с содержанием желчи 0.01–5% инкубировали при 40 °С в течение 1 ч. Каждые 15 мин проводили отбор проб и измеряли активность ферментов по стандартной методике. Параллельно проводили контрольный эксперимент, в котором раствор фермента инкубировали при 40 °С в течение 1 ч в отсутствие желчи.

1.5. Оценка способности фитазы к увеличению питательной ценности кормов птиц. Метод основан на определении количества неорганического фосфора, образующегося в результате обработки кормов фитазой [13]. Для работы использовали комбикорма для бройлеров «Старт ПК-5.0» (37% кукуруза; 30% соевый шрот; 20% пшеница; 6% рапсовый жмых и масло; 4% добавки треонина, фосфатов, жиров, пищевой соды, лизина, мела; 2% кукурузный глютен) и «Рост ПК-5.1-3» (46% пшеница; 23% кукуруза; 15% соевый шрот; 6% подсолнечный жмых; 5% подсолнечное масло; 5% рыбная мука; 5% поваренная соль и известковая мука). Навески кормов обрабатывали раствором фермента в концентрации 1000 ед./кг корма и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С. Корма измельчали в ступке, добавляли 0.1 М ацетат натрия (рН 4.5), после чего смесь центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об./мин. Активность фитазы в полученном супернатанте оценивали по количеству высвободившегося неорганического фосфора, который измеряли колориметрически.

1.6. Влияние микробных ферментов на продуктивность и усвояемость питательных веществ цыплятами. Эксперименты проводили на цыплятах-бройлерах породы Хабборд в условиях вивария фермерского хозяйства КФК Алимчуевой З.И. (Россия, Республика Марий Эл, Медведевский р-н, д. Среднее Азяково). Кормление птицы осуществляли сухими комбикормами с параметрами питательной ценности, соответствующими рекомендуемым нормам кормления. Были сформированы экспериментальные группы, в каждую из которых входило по 15 цыплят-бройлеров. Первая группа – контрольная, вторая группа дополнительно к рациону получала протеиназу из расчета 10 ед./кг корма, третья группа – фитазу в концентрации 1000 ед./кг корма. До пятидневного возраста цыплята всех групп получали основной рацион, с шестидневного – опытные кормосмеси. Продолжительность эксперимента – 5 недель. Для изучения динамики роста птиц проводили еженедельное взвешивание. Для исследования влияния изучаемой кормовой добавки на усвояемость питательных веществ проводили балансировый опыт. В экспериментах учитывали количество и химический состав потребленного корма и выделенного помета.

1.7. Статистическая обработка данных. Математическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism, GraphPad Software (LA Jolla,

СА, США) с использованием двухстороннего дисперсионного анализа Two-way ANOVA и критерия Тьюки для множественного парного сравнения количественных показателей разных групп. Статистический анализ полученных результатов проводили, руководствуясь рекомендациями [14].

2. Результаты и их обсуждение

На протяжении последних десятилетий микробные ферменты активно применяются в различных сферах деятельности человека. Фитазы нашли широкое применение в сельском хозяйстве, где используются в качестве пищевых добавок в кормах многих сельскохозяйственных животных [15]. Применение фитаз позволяет улучшать усвояемость фитатного фосфора и снижать загрязнение окружающей среды пометом с неусвоенными птицей питательными элементами [16]. Фитаза AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1 принадлежит к семейству гистициновых кислых фитаз, успешно используемых в качестве кормовых добавок [17]. Низкие значения pH, при которых поддерживается активность и стабильность фермента [18], позволяют ему работать в кислой среде желудка животных, что перспективно для использования фитазы *Pantoea* sp. 3.5.1 в качестве добавки в корма животных.

Другой группой ферментов, применяющихся в качестве пищевых добавок, являются протеиназы. Субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus* – фермент с широкой субстратной специфичностью, расщепляющий связи, образованные гидрофобными аминокислотами. Поскольку фитаты образуют комплексы с белками, становится все более актуальной проблема расщепления белкового компонента кормов, включая белки и пептиды, образующие комплексы с фитатом.

На сегодняшний день не существует «идеального» биопрепарата, способного удовлетворить все практические нужды. Поэтому ведется активный поиск новых эффективных ферментов для расширения арсенала уже используемых на рынке коммерческих препаратов. В связи с этим представляло интерес оценить полученные нами микробные ферменты (фитазу и протеиназу) в качестве потенциальных кормовых добавок.

2.1. Стабильность протеиназы в условиях ЖКТ кур. Важной характеристикой ферментов с точки зрения их практического применения в качестве кормовых добавок в птицеводстве является способность сохранять свою стабильность в условиях практического применения. По мере того, как ферменты продвигаются по ЖКТ птицы, на них влияют повышенная внутренняя температура тела и кислотность, значения которой в разных отделах ЖКТ отличаются. Мы исследовали активность протеиназы при различных значениях pH среды по аналогии с ЖКТ. В слабокислой среде при pH 5.5 (зоб) протеиназа полностью сохраняла активность. При переходе в кислую среду при pH 2.9 (желудок) активность фермента снижалась на 40%, а при переходе в щелочные условия в диапазоне pH 6.5–8 (тонкий кишечник и толстый кишечник) активность фермента возрастала относительно контроля на 10–13% (рис. 1). Полученные данные показали, что протеиназа будет активна на всем протяжении ЖКТ цыплят-бройлеров. Таким образом, при значениях pH, аналогичных значениям pH ЖКТ птицы, протеиназа полностью сохраняла стабильность.

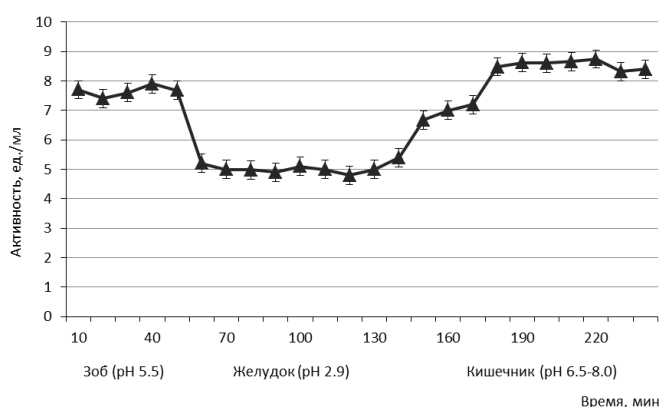


Рис. 1. Исследование стабильности протеиназы в ЖКТ цыплят-бройлеров

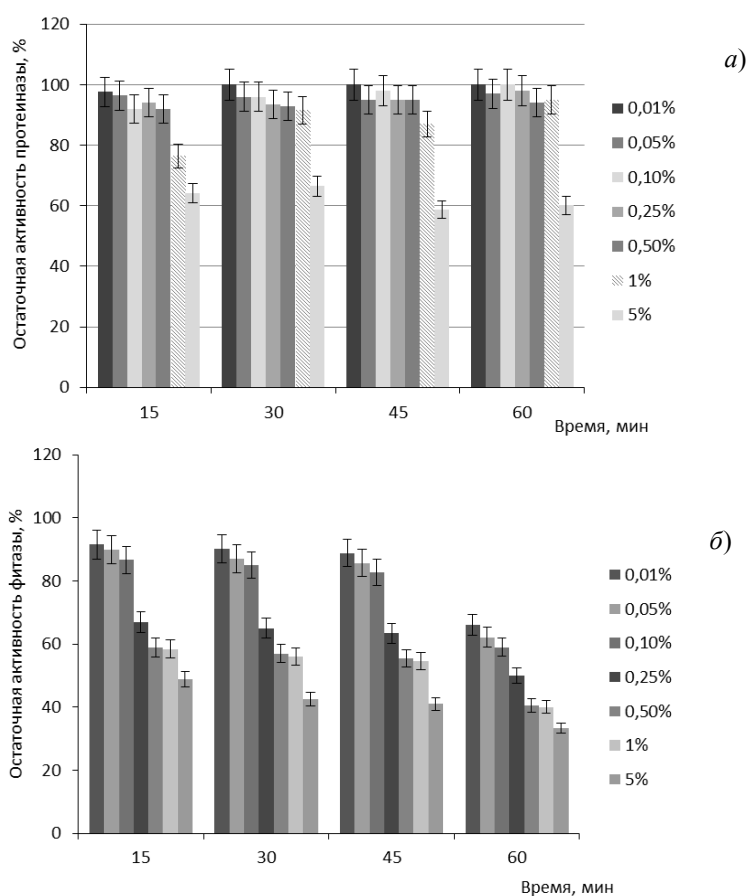


Рис. 2. Влияние желчи на стабильность фитазы AgrP (а) и протеазы ArgPr (б)

2.2. Влияние желчи на стабильность фитазы и протеиназы. Исследовали влияние желчи на стабильность микробных ферментов. При концентрациях желчи в ферментном растворе от 0.01% до 0.25% в течение 1 ч фитаза сохраняла более 50% своей активности ($p < 0.05$). При увеличении концентрации желчи до 0.5–1% и 5% остаточная активность фермента составила около 40% и 35% ($p < 0.05$) соответственно (рис. 2, а). Уменьшение активности фермента при более

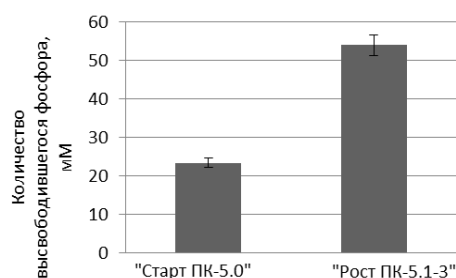


Рис. 3. Высвобождение фосфора при гидролизе фитазой кормов птиц

высоких концентрациях желчи, по-видимому, связано с влиянием щелочной реакции желчи, в то время как фитаза AgpP относится к семейству гистидиновых кислых фитаз, проявляющих активность при низких значениях pH [19]. При концентрациях желчи от 0.01% до 0.05% в течение 1 ч активность протеиназы оставалась на уровне контроля. При увеличении концентрации до 1% наблюдали снижение активности фермента на 10%. При концентрации желчи 5% остаточная активность фермента составила 60% (рис. 2, б). Полученные данные указывают, что микробные ферменты в условиях ЖКТ кур будут сохранять каталитическую активность.

2.3. Оценка способности ферментов к увеличению питательной ценности кормов птиц. Исследовали способность фитазы AgpP гидролизовать фитат в составе кормов. Используемые в работе корма «Старт ПК-5.0» и «Рост ПК-5.1-3» применяют для кормления кур разного возраста. Корм «Старт ПК-5.0» является полноценным рационом для птиц с первых дней жизни. Его используют для кормления цыплят-бройлеров в возрасте от 0 до 7 сут. Кормом «Рост ПК-5.1-3» кормят кур в возрасте от 7 до 28 сут. Установили, что фитаза способна высвободить фосфор из компонентов корма «Рост ПК-5.1-3» в среднем на 57% больше, чем из компонентов корма «Старт ПК-5.1-3» (рис. 3). Поэтому фитаза AgpP будет более эффективна в диетах растущих куриц, чем цыплят.

2.4. Влияние фитазы и протеиназы на продуктивность и усвояемость питательных веществ цыплятами. Исследовали влияние микробных ферментов на продуктивность, перевариваемость и усвояемость питательных веществ цыплятами-бройлерами породы Хабборд. Для экспериментов были сформированы три экспериментальные группы цыплят: контрольная группа получала только комбикорм, 1-я и 2-я опытные группы – комбикорм с добавлением протеиназы и фитазы в концентрации 10 и 1000 ед./кг корма соответственно.

Живая биомасса и среднесуточный прирост являются важным зоотехническим показателем производственной деятельности любой отрасли животноводства и птицеводства. Для изучения динамики роста птиц в течение всего учетного периода проводили еженедельное взвешивание. Полученные изменения живой массы бройлеров показали увеличение абсолютного прироста биомассы в экспериментальных группах по сравнению с контролем: для 1-й опытной группы она составила 1528.7 ± 42 г, для 2-й опытной – 1469.4 ± 33.5 г, а для контрольной – 1465.9 ± 37.4 г; сохранность птицы во всех группах составила 100% (табл. 1).

Табл. 1

Изменение живой массы и сохранности цыплят-бройлеров за период опыта (среднее $\pm t_{0.05} \cdot SE$, $n = 30$)

Показатели	Экспериментальные группы		
	Контрольная	1	2
1 сут (живая масса цыплят в г)	22.1 \pm 0.21	22.0 \pm 0.18	22.5 \pm 0.20
8 сут (живая масса цыплят в г)	306.8 \pm 0.36	295.8 \pm 0.31	297.6 \pm 0.35
15 сут (живая масса цыплят в г)	373.6 \pm 1.02	382.9 \pm 0.98	370.8 \pm 1.14
22 сут (живая масса цыплят в г)	591.1 \pm 2.20	580.5 \pm 2.14	572.3 \pm 1.80
28 сут (живая масса цыплят в г)	926.0 \pm 4.55	985.1 \pm 3.61	978.5 \pm 3.44
35 сут (живая масса цыплят в г)	1488.3 \pm 8.67	1550.7 \pm 6.52	1491.9 \pm 7.98
Абсолютный прирост, г	1465.9 \pm 37.4	1528.7 \pm 42.0	1469.4 \pm 33.5
Сохранность поголовья, %	100	100	100

Примечание: $p < 0.05$.

За первые семь дней учетного периода самый высокий среднесуточный прирост живой массы бройлеров наблюдался в контрольной группе и составил 11.25 г, что выше, чем в 1-й и 2-й опытных группах, на 1.3% и 1.4% соответственно. Однако в последующий возрастной период (8–14 дней) наибольший среднесуточный прирост живой массы имели бройлеры 1-й опытной группы, что превосходило значения данного показателя контрольной и 2-й опытной групп на 3.5% и 2.8% соответственно. Аналогичная закономерность наблюдается при выращивании бройлеров с 15-го по 21-й день. К 35-му дню 1-я опытная группа имела среднесуточный прирост живой массы 71.7 г, что превышает значения в контрольной и 2-й опытной группах на 2.21 и 1.52 г соответственно (табл. 1).

Влияние изучаемой кормовой добавки на усвоение кальция, фосфора и азота исследовали с помощью балансового опыта, в ходе которого учитывалось количество каждого элемента в среднесуточной дозе корма и в помете. Переваримость поступающих в организм питательных веществ во многом зависит от ферментативной активности желёз внутренней секреции, секреторной функции отделов ЖКТ и отдельных органов. Повышение переваримости органического вещества рациона цыплят-бройлеров опытных групп произошло в основном за счет переваримости жира и протеина. Самая высокая переваримость протеина наблюдалась в 1-й опытной группе и составила 81.1 \pm 0.5%, затем во 2-й – 76.8 \pm 0.4%, что выше по сравнению с контрольной группой на 7.1 и 2.8% соответственно. Переваримость клетчатки находилась в пределах от 10.3 \pm 0.4% у бройлеров контрольной группы до 13.0 \pm 0.3% во 2-й группе. Переваримость жира составила в контрольной группе 58.5 \pm 0.9%, в 1-й группе – 60.1 \pm 1.1% и во 2-й группе – 59.8 \pm 0.7% (табл. 2).

В ходе балансового опыта кроме переваримости органических веществ определены баланс и коэффициенты усвоения азота, кальция и фосфора (табл. 3). Азотистые вещества корма, попадая в ЖКТ животного, подвергаются гидролизу до свободных аминокислот, которые используются для роста и развития растущего организма, восстановления изношенных тканей, роста и развития плода. Поэтому об эффективности использования протеина корма в различные возрастные периоды у сельскохозяйственных животных и птицы можно судить по балансу азота корма. Баланс азота показал, что в 1-й группе отмечался наибольший

Табл. 2

Коэффициенты переваримости питательных веществ комбикорма, %

Показатели переваримости	Экспериментальные группы		
	Контрольная	1-я	2-я
Протеин	74 ± 0.6	81.1 ± 0.5	76.8 ± 0.4
Сухое вещество	72.6 ± 0.9	75.5 ± 1.1	74.9 ± 0.6
Клетчатк	10.3 ± 0.4	12.4 ± 0.2	13.0 ± 0.3
Жир	58.5 ± 0.9	60.1 ± 1.1	59.8 ± 0.7

Примечание: $p < 0.05$.

Табл. 3

Баланс кальция, фосфора и азота при введении в рацион ферментных препаратов

Показатели	Экспериментальные группы		
	Контрольная	1-я	2-я
Кальций			
Принято с кормом, г	1.20 ± 0.01	1.21 ± 0.008	1.20 ± 0.006
Выделено с пометом, г	0.52 ± 0.007	0.49 ± 0.004	0.49 ± 0.003
Переварено, г	0.68 ± 0.005	0.72 ± 0.01	0.71 ± 0.008
Коэффициент переваримости, %	56.6	59.5	59.1
Фосфор			
Принято с кормом, г	0.75 ± 0.003	0.71 ± 0.004	0.74 ± 0.003
Выделено с пометом, г	0.53 ± 0.002	0.53 ± 0.005	0.44 ± 0.002
Переварено, г	0.22 ± 0.006	0.18 ± 0.007	0.30 ± 0.004
Коэффициент переваримости, %	29.3	25.3	40.5
Азот			
Принято с кормом, г	3.17 ± 0.04	3.10 ± 0.02	3.12 ± 0.03
Выделено с пометом, г	1.48 ± 0.005	1.35 ± 0.008	1.44 ± 0.005
Переварено, г	1.69 ± 0.008	1.75 ± 0.01	1.68 ± 0.006
Коэффициент переваримости, %	53.3	56.4	53.8

Примечание: $p < 0.05$.

коэффициент переваримости, который составил 56.4%, что больше на 3.1% и 2.6% по сравнению с показателем контрольной и 2-й группы соответственно. По-видимому, это связано с тем, что во 2-й группе применялась протеаза, которая повысила усвоение белка и соответственно баланс азота. Наибольший коэффициент переваримости кальция отмечался в 1-й группе, где составил 59.5%, а наименьший (56.6%) – в контрольной группе. Применение фитазы во 2-й группе оказало существенное влияние на усвоение фосфора – коэффициент переваримости составил 40.5% (0.30 г). В контрольной группе данный показатель составил 29.3% (0.22 г). Во 2-й группе количество переваренного фосфора было на 18.1% меньше, чем в контрольной.

Заключение

Результаты настоящего исследования показали, что введение в рацион ферментных препаратов фитазы *AgpP Pantoea* sp. 3.5.1 и протеиназы *ArgPr B. pumilus* улучшает переваримость и усвоение питательных веществ корма. Опытным путем установлено, что принятый с кормом белок достаточно рационально использовался организмом птицы, о чем свидетельствуют высокие ко-

эффиценты переваримости в опытных группах относительно контрольной. Увеличение переваримости и использования питательных веществ корма связано с замедлением скорости прохождения пищевых масс по кишечнику и более длительной обработкой их пищеварительными ферментами, что свидетельствует об улучшении жирового обмена в организме. Таким образом, *in vitro* и *in vivo* было показано, что фитаза AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1 и субтилизиноподобная протеиназа ArgPr *B. pumilus* обладают потенциалом для применения в качестве кормовых добавок в птицеводстве.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров, и при финансовой поддержке РФФ (проект № 16-16-04062).

Литература

1. Hume M.E. Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics // *Poult. Sci.* – 2011. – V. 90, No 11. – P. 2663–2669. – doi: 10.3382/ps.2010-01030.
2. dos Santos T.T., O'Neill M., González-Ortiz G., Camacho-Fernández D., López-Coello C. Xylanase, protease and superdosing phytase interactions in broiler performance, carcass yield and digesta transit time // *Anim. Nutr.* – 2017. – V. 3, No 2. – P. 121–126. – doi: 10.1016/j.aninu.2017.02.001.
3. Cowieson A.J., Wilccock P., Bedford M.R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics // *World's Poult. Sci.* – 2011. – V. 67, No 2. – P. 225–235. – doi: 10.1017/S0043933911000250.
4. Ghazi S., Rooke J.A., Galbraith H., Bedford M.R. The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels // *Br. Poult. Sci.* – 2002. – V. 43, No 1. – P. 70–77. – doi: 10.1080/00071660120109935.
5. Dozier W.A., Corzo A., Kidd M.T., Tillman P.B., McMurtry J.P., Branton S.L. Digestible lysine requirements of male broilers from 28 to 42 days of age // *Poult. Sci.* – 2010. – V. 89, No 10. – P. 2173–2182. – doi: 10.3382/ps.2010-00710.
6. Angel C.R., Saylor W., Viera S.L., Ward N. Effects of a mono component protease on performance and protein utilization in seven- to twenty-two-day-old broiler chickens // *Poult. Sci.* – 2011. – V. 90, No 10. – P. 2281–2286. – doi: 10.3382/ps.2011-01482.
7. Timbermont L., Lanckriet A., Dewulf J., Nollet N., Schwarzer K., Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils // *Avian Pathol.* – 2010. – V. 39, No 2. – P. 117–121. – doi: 10.1080/03079451003610586.
8. Yan W., Sun C., Yuan J., Yang N. Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of *Lactobacillus* and cecal microbiota in chicken feed efficiency // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – Art. 45308, P. 1–11. – doi: 10.1038/srep45308.
9. Troshagina D.S., Suleimanova A.D., Itkina D.L., Sharipova M.R. Cloning of phytase genes from *Pantoea* sp. 3.5.1 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 in *Pichia pastoris* // *BioNanoScience.* – 2018. – V. 8. – P. 1045–1053. – doi: 10.1007/s12668-018-0563-y.

10. Koryagina A., Rudakova N., Toymentseva A., Sharipova M. Selection of the optimal strain-producer of subtilisin-like proteinase of *Bacillus pumilus* // FEBS Open Bio. – 2017. – V. 8, Suppl. 1. – P. 192–193. – doi: 10.1002/2211-5463.12453.
11. Greiner R. Degradation of myo-inositol hexakisphosphate by a phytate-degrading enzyme from *Pantoea agglomerans* // Protein J. – 2004. – V. 23, No 8. – P. 577–585. – doi: 10.1007/s10930-004-7884-0.
12. Demidyuk I.V., Romanova D.V., Nosovskaya I.V., Demidyuk E.A., Chestukhina G.G., Kuranova I.P., Kostrov S.V. Modification of substrate-binding site of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius* // Prot. Eng. Des. Sel. – 2004. – V. 17, No 5. – P. 411–416. – doi: 10.1093/protein/gzh050.
13. Синицына О.А., Федорова Е.А., Гусаков А.В., Упоров И.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Чулкин А.М., Винецкий Ю.П., Синицын А.П. Выделение и свойства внеклеточной фитазы *Penicillium canescens* // Биохимия. – 2006. – Т. 71, Вып. 9. – С. 1260–1268.
14. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.
15. Abd-Alhadi R., Sumainah G., AlBalaa B. Production of extracellular phytase from *Bacillus subtilis* isolated from Syrian soil // Int. J. Pharm. Tech. Res. – 2015. – V. 8, No 1 – P. 154–159.
16. Wang W., Wang Z., Yang H., Cao Y., Zhu X., Zhao Y. Effects of phytase supplementation on growth performance, slaughter performance, growth of internal organs and small intestine, and serum biochemical parameters of broilers // Open J. Anim. Sci. – 2011. – V. 3, No 3. – P. 236–241. – doi:10.4236/ojas.2013.33035.
17. Lee J., Choi Y., Lee P., Kang S. Bok J., Cho J. Recombinant production of *Penicillium oxalicum* PJ3 phytase in *Pichia pastoris* // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 23, No 3. – P. 443–446. – doi: 10.1007/s11274-006-9236-z.
18. Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakhrov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1 // Appl. Environ. Microbiol. – 2015. – V. 81, No 19. – P. 6790–6799. – doi: 10.1128/AEM.01384-15.
19. Yao M.-Z., Zhang Y.-H., Lu W.-L., Hu M.-Q. W., Wang A.-H. Phytases: Crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications // J. Appl. Microbiol. – 2011. – V. 112, No 1. – P. 1–14. – doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05181.x.

Поступила в редакцию
28.01.19

Корягина Анастасия Олеговна, младший научный сотрудник НИЛ «Микробные биотехнологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: tihonovaa093@gmail.com

Бульмакова Дарья Сергеевна, младший научный сотрудник НИЛ «Микробные биотехнологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: dashunka@mail.ru

Сулейманова Алия Дамировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник НИЛ «Микробные биотехнологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: aliya.kzn@gmail.com

Рудакова Наталья Леонидовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ «Микробные биотехнологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: natalialrudakova@mail.ru

Марданова Айслу Миркасымовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: mardanovaayslu@mail.ru

Смоленцев Сергей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры технологии хранения и переработки продукции растениеводства

Марийский государственный университет
пл. Ленина, д. 1, г. Йошкар-Ола, 424000, Россия
E-mail: Smolentsev82@mail.ru

Шарипова Маргарита Рашидовна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: marsharipova@gmail.com

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2019, vol. 161, no. 3, pp. 459–471

doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.459-471

Bacterial Enzymes as Potential Feed Additives in Poultry Farming

A.O. Koryagina^{a*}, D.S. Bul'makova^{a**}, A.D. Suleimanova^{a***}, N.L. Rudakova^{a****},
A.M. Mardanova^{a*****}, S.Y. Smolencev^{b*****}, M.R. Sharipova^{a*****}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bMari State University, Yoshkar-Ola, 424000 Russia

E-mail: *tihonovao93@gmail.com, **dashunka_@mail.ru, ***aliya.kzn@gmail.com,
****natalialrudakova@mail.ru, *****mardanovaayslu@mail.ru, *****Smolentsev82@mail.ru,
*****marsharipova@gmail.com

Received January 28, 2019

Abstract

The problem of obtaining economic benefits in poultry breeding from complete absorption of feeds by domestic fowls through increasing the digestibility of nutrients remains urgent. The addition of exogenous enzymes to broiler rations enhances the energy and protein intake by improving the substrate bioavailability. The presence of antinutritional dietary factors in poultry feeds (non-starch polysaccharides, protease inhibitors, lectins, and phytates) indicates the possibility of using exogenous enzymes. We assessed the potential of histidine acid phytase *Pantoea* sp. 3.5.1 and subtilisin-like proteinase *B. pumilus* as feed additives. When the enzymes pass through the digestive tract, they are exposed to elevated body temperatures of the fowl (40 °C), pH changes in different parts of the digestive tract, and the influence of bile. Thus, it was important to study the stability of the enzymes under these conditions. It was shown that proteinase maintains its activity throughout the gastrointestinal tract of the fowl: in a weakly acidic environment (pH 5.5, goiter), the enzyme activity remained full (100%); at pH 2.9 (stomach), its decreased by 40%; and under the alkaline conditions of pH 6.5–8.0 (small and large intestine), its values were restored and increased by 13% relative to the control group. When exposed to bile at the concentrations from

0.01% to 0.25% for 1 h, phytase retained more than 50% of its activity ($p < 0.05$). At the concentrations of bile from 0.01% to 0.05% (1-h exposure), the activity of proteinase remained at the control level. The data obtained show that microbial enzymes in the digestive tract of domestic fowls retain catalytic activity. In the course of the balance experiment, the group of chickens treated with proteinase at the concentration of 10 U/kg demonstrated the highest nitrogen and calcium digestibility coefficients (56.4% and 59.5%, respectively). The use of phytase (1000 U/kg) had a significant impact on the absorption of phosphorus (the digestibility coefficient was 40.5% (0.30 g)). Thus, *B. pumilus* proteinase and *Pantoea* sp. 3.5.1 phytase have the potential to be used as feed additives for chickens.

Keywords: phytase, phytate, proteinase, feed additives, microorganisms

Acknowledgments. The work is performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University and supported by the Russian Science Foundation (project no. 16-16-04062).

Figure Captions

Fig. 1. Proteinase stability in the digestive tract of broiler chickens.

Fig. 2. Bile influence on the stability of AgpP phytase (a) and AprBp proteinase (b).

Fig. 3. Phosphorus release upon phytase hydrolysis of poultry feeds.

References

1. Hume M.E. Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poult. Sci.*, 2011, vol. 90, no. 11, pp. 2663–2669. doi: 10.3382/ps.2010-01030.
2. dos Santos T.T., O'Neill M., González-Ortiz G., Camacho-Fernández D., López-Coello C. Xylanase, protease and superdosing phytase interactions in broiler performance, carcass yield and digesta transit time. *Anim. Nutr.*, 2017, vol. 3, no. 2, pp. 121–126. doi: 10.1016/j.aninu.2017.02.001.
3. Cowieson A.J., Wilcock P., Bedford M.R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poult. Sci.*, 2011, vol. 67, no. 2, pp. 225–235. doi: 10.1017/S0043933911000250.
4. Ghazi S., Rooke J.A., Galbraith H., Bedford M.R. The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. *Br. Poult. Sci.*, 2002, vol. 43, no. 1, pp. 70–77. doi: 10.1080/00071660120109935.
5. Dozier W.A., Corzo A., Kidd M.T., Tillman P.B., McMurtry J.P., Branton S.L. Digestible lysine requirements of male broilers from 28 to 42 days of age. *Poult. Sci.*, 2010, vol. 89, no. 10, pp. 2173–2182. doi: 10.3382/ps.2010-00710.
6. Angel C.R., Saylor W., Viera S.L., Ward N. Effects of a mono component protease on performance and protein utilization in seven- to twenty-two-day-old broiler chickens. *Poult. Sci.*, 2011, vol. 90, no. 10, pp. 2281–2286. doi: 10.3382/ps.2011-01482.
7. Timbermont L., Lanckriet A., Dewulf J., Nollet N., Schwarzer K., Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F. Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathol.*, 2010, vol. 39, no. 2, pp. 117–121. doi: 10.1080/03079451003610586.
8. Yan W., Sun C., Yuan J., Yang N. Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of *Lactobacillus* and cecal microbiota in chicken feed efficiency. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, art. 45308, pp. 1–11. doi: 10.1038/srep45308.
9. Troshagina D.S., Suleimanova A.D., Itkina D.L., Sharipova M.R. Cloning of phytase genes from *Pantoea* sp. 3.5.1 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 in *Pichia pastoris*. *BioNanoScience*, 2018, vol. 8, pp. 1045–1053. doi: 10.1007/s12668-018-0563-y.
10. Koryagina A., Rudakova N., Toymentseva A., Sharipova M. Selection of the optimal strain-producer of subtilisin-like proteinase of *Bacillus pumilus*. *FEBS Open Bio*, 2017, vol. 8, suppl. 1, pp. 192–193. doi: 10.1002/2211-5463.12453.
11. Greiner R. Degradation of myo-inositol hexakisphosphate by a phytate-degrading enzyme from *Pantoea agglomerans*. *Protein J.*, 2004, vol. 23, no. 8, pp. 577–585. doi: 10.1007/s10930-004-7884-0.
12. Demidyuk I.V., Romanova D.V., Nosovskaya I.V., Demidyuk E.A., Chestukhina G.G., Kuranova I.P., Kostrov S.V. Modification of substrate-binding site of glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius*. *Protein Eng., Des. Sel.*, 2004, vol. 17, no. 5, pp. 411–416. doi: 10.1093/protein/gzh050.

13. Sinitsyna O.A., Fedorova E.A., Gusakov A.V., Uporov I.V., Sokolova L.M., Bubnova T.M., Okunev O.N., Chulkin A.M., Vinetskii Yu.P., Sinitsyn A.P. Isolation and characterization of extracellular phytase a from *Penicillium canescens*. *Biokhimiya*, 2006, vol. 71, no. 9, pp. 1260–1268. (In Russian)
14. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh* [Statistical Methods in Microbiological Research]. Leningrad, Medgiz, 1962. 180 p. (In Russian)
15. Abd-Alhadi R., Sumainah G., AlBalaa B. Production of extracellular phytase from *Bacillus subtilis* isolated from Syrian soil. *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, 2015, vol. 8, no. 1, pp. 154–159.
16. Wang W., Wang Z., Yang H., Cao Y., Zhu X., Zhao Y. Effects of phytase supplementation on growth performance, slaughter performance, growth of internal organs and small intestine, and serum biochemical parameters of broilers. *Open J. Anim. Sci.*, 2011, vol. 3, no. 3, pp. 236–241. doi:10.4236/ojas.2013.33035.
17. Lee J., Choi Y., Lee P., Kang S. Bok J., Cho J. Recombinant production of *Penicillium oxalicum* PJ3 phytase in *Pichia pastoris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, vol. 23, no. 3, pp. 443–446. doi: 10.1007/s11274-006-9236-z.
18. Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, vol. 81, no. 19, pp. 6790–6799. doi: 10.1128/AEM.01384-15.
19. Yao M.-Z., Zhang Y.-H., Lu W.-L., Hu M.-Q. W., Wang A.-H. Phytases: Crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.*, 2011, vol. 112, no. 1, pp. 1–14. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05181.x.

Для цитирования: Корягина А.О., Бульмакова Д.С., Сулейманова А.Д., Рудакова Н.Л., Марданова А.М., Смоленцев С.Ю., Шарипова М.Р. Бактериальные ферменты как потенциальные кормовые добавки в птицеводстве // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2019. – Т. 161, кн. 3. – С. 459–471. – doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.459-471.

For citation: Koryagina A.O., Bul'makova D.S., Suleimanova A.D., Rudakova N.L., Mardanova A.M., Smolencev S.Y., Sharipova M.R. Bacterial enzymes as potential feed additives in poultry farming. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2019, vol. 161, no. 3, pp. 459–471. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.459-471. (In Russian)