

УДК 636.03

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-344-1-30-38>Тип статьи: Краткий обзор
Type of article: Brief review**Крюков В.С.¹,
Зиновьев С.В.²,
Некрасов Р.В.³**¹ ООО «Кормогран», Москва;² ВНИИПП – филиал ФНЦ ВНИТИП,
п. Ржавки Московской обл. РФ;³ ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
Подольск-Дубровицы Московской обл. РФ**Ключевые слова:** пищеварение, ферменты, протеазы эндогенные, протеазы экзогенные, кератиназы, ингибиторы трипсина, переваривание протеина, птица, свиньи.**Для цитирования:** Крюков В.С., Зиновьев С.В., Некрасов Р.В. Протеазы в питании моногастрических животных. *Аграрная наука*. 2021; 344 (1): 30–38.<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-344-1-30-38>**Конфликт интересов отсутствует****Valery S. Kryukov¹,
Sergey V. Zinoviev²,
Roman V. Nekrasov³**¹ LLC "Kormogran"
Moscow, Russia, kryukov.v.s@mail.ru² Institute of Poultry Processing Industry –
branch of Federal Science Centre Poultry
Institute
Rzhavki village, Moscow oblast, Russian Feder-
ation neollit_13@mail.ru³ Federal Research Center for Animal Husband-
ry named after Academy Member L.K. Ernst
Podolsk-Dubrovitsy, Moscow region, Russia
nek_roman@mail.ru**Key words:** digestion, enzymes, endoge-
nous proteases, exogenous proteases, ker-
atinases, trypsin inhibitors, protein digestion,
poultry, pigs.**For citation:** Kryukov V.S., Zinoviev S.V.,
Nekrasov R.V. Proteases in the diet of mono-
gastric animals. *Agrarian Science*. 2021; 344
(1): 30–38. (In Russ.)<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-344-1-30-38>**There is no conflict of interests**

Протеазы в питании моногастрических животных

РЕЗЮМЕ

В организме существует множество протеаз, которые регулируются примерно 2% генома человека. Из них на долю, участвующую в пищеварении, приходится лишь малая часть. Несмотря на это механизмы действия пищеварительных протеаз изучены слабее, чем карбогидраз и липаз. Включение экзогенных протеаз в корма для молодняка животных часто сопровождается улучшением использования белка и других питательных веществ. Экзогенные протеазы разрушают ингибиторы эндогенных протеаз и лектины, содержащиеся в кормах. Интерес представляют щелочные протеазы в связи с их более широкой субстратной специфичностью и сохранением активности на протяжении всего желудочно-кишечного тракта. В эту группу входят кератиназы, которые переваривают белки, недоступные для расщепления протеазами и пептидазами животных. Кератиназы переваривают агглютинины, глицинин и β-конглицинин и соединительнотканские белки, которые устойчивы к действию ферментов ЖКТ и ряда экзогенных протеаз. Описаны предполагаемые причины нестабильных результатов при использовании кормовых протеаз. Указаны их опосредованные эффекты положительного действия, не связанные с протеолизом. В качестве кормовых протеаз целесообразно использовать протеазы, обладающие кератинолитической активностью.

Proteases in the diet of monogastric animals

ABSTRACT

There are many proteases, and about 2% of the human genome is involved in the regulation of their formation. The share of proteases involved in digestion accounts for only a small part. Despite this, the mechanisms of action of digestive proteases are less studied than carbohydrases and lipases. The incorporation of exogenous proteases into young animal feeds is often accompanied by improved utilization of protein and other nutrients. Exogenous proteases degrade inhibitors of the endogenous protease and lectins in feed. Alkaline proteases are of interest due to their broader substrate specificity and activity throughout the entire gastrointestinal tract. This group includes keratinases, which digest proteins inaccessible for cleavage by proteases and peptidases of animals. Keratinases digest agglutinins, glycinin and β-conglycinin and connective tissue proteins, which are resistant to the action of gastrointestinal enzymes and a number of exogenous proteases. The alleged reasons for the inconsistent results when using feed proteases are described. Their mediated positive effects not associated with proteolysis are indicated. It is advisable to use proteases with keratinolytic activity as fodder proteases.

Поступила: 27 ноября
После доработки: 7 января
Принята к публикации: 8 январяReceived: 27 november
Revised: 7 january
Accepted: 8 january

Введение

Протеазы представлены обширной группой ферментов, расщепляющих белки по пептидным связям, отличающихся широкой специфичностью: одни из них — эндопептидазы — разрывают связи внутри полипептидов, а другие — экзопептидазы (аминопептидазы), отщепляют аминокислоты, ди-, трипептиды, находящиеся у $-NH_2$ конца полипептида, или карбоксипептидазы, отщепляющие аминокислоты, находящиеся у $-COOH$ конца молекулы. На основе состава и последовательности аминокислот в активных центрах протеазы подразделяют на семь групп: серин-, цистеин-, треонин-, аспарагин- и глутаминовые протеазы, металлопротеазы и аспарагиновые пептидные лиазы (López-Otín and Bond, 2008). Детально классификация и свойства протеаз описаны в обзорах (Rao et al., 1998; Razzaq et al., 2019; Singh et al., 2016). В последнее время с появлением новых аналитических инструментов и созданием программ обработки больших массивов полученных данных, открываются новые горизонты для выяснения деталей функционирования протеаз в организме (Yu et al., 2020).

Внутриклеточные протеазы участвуют в регуляции метаболизма, тогда как внеклеточные протеазы катализируют гидролиз нативных белков до более мелких фрагментов для последующего поглощения клеткой. Несмотря на широкую распространённость, секреция протеаз, участвующих в пищеварении в раннем возрасте может быть недостаточной, поэтому включение их в корма для птицы первых дней жизни и поросят после отъёма оказывается полезным. В кормах присутствуют белковые ингибиторы пищеварения, а также белки, недоступные для переваривания собственными протеазами, но перевариваемые экзогенными ферментами.

Действие протеаз

Впервые изучение влияния включения в рацион протеаз на животных было проведено с использованием пепсина и панкреатина (Lewis et al., 1955). Хотя эти ферменты вырабатываются в организме, их использование увеличило прирост живой массы поросят, и оказалось, что действие каждого из них было независимым, при их совместном использовании эффект усиливался. Первые исследования с использованием экзогенных протеаз были проведены спустя 30 лет, в них описано влияние протеаз, полученных путём микробиологического синтеза (Castanon and Marquardt, 1989).

Проведя анализ результатов, опубликованных в 2009–2011 годах, пришли к выводу, что под действием монокомпонентной протеазы переваримость протеина в подвздошной кишке у свиней и птицы повышалась в среднем на 3,74% ($P > 0,001$), максимально высвобождая треонин — до 5,6% ($P > 0,001$) и минимально — глутаминовую кислоту — 2,7% ($P < 0,05$). Средняя переваримость часто используемых аминокислот (лизин, метионин, треонин) повысилась на 4,5%. Действие протеазы не зависело от вида животных (птица, свинья). Использование в контрольном варианте рациона с низкой переваримостью протеина — в пределах 70%, приводило к возрастанию переваренных аминокислот в подавляющем большинстве случаев на 10%; если исходная переваримость составляла 90%, то добавление протеазы увеличивало её не более чем на 2% в 60% случаев. Авторы пришли к заключению, что величина врождённой переваримости эндогенными протеазами является основным фактором, определяющим величину реакции ЖКТ на добавленную протеазу (Cowieson

and Roos, 2014). Позднее был проведён более полный метаанализ, в который было включено 67 испытаний, проведенных в период с 1955 по 2017 год (Lee et al., 2018). Мета-анализу были подвергнуты результаты по 44 коммерческим и экспериментальным протеазам. Примерно пятая часть результатов получена в опытах на свиньях и 81% — на бройлерах и индейках. Включение в корма протеаз слегка повышало потребление корма у птицы (+0,49%) и снижало у свиней (-0,78%), при этом живая масса в конце эксперимента возросла у птицы на 1,38% и у свиней — на 4,10%; расход корма на привес у птицы снизился на 0,92% и у свиней — 4,12%. Меньшую реакцию на протеазы со стороны птицы авторы объясняют тем, что птица в контрольных группах имела относительно высокую исходную продуктивность, тогда как влияние протеаз на свиней могло не зависеть от продуктивности животных в контрольных группах. Среднее увеличение кажущейся переваримости под влиянием протеазы составило $1,6 \pm 0,3\%$, находится в диапазоне 1,2–2,6%. Большинство исследований подтвердили, что при высокой переваримости аминокислот под влиянием эндогенных ферментов реакция на экзогенную протеазу снижалась. Это заключение совпадает с выводом, сделанном на основании предыдущего мета-анализа (Cowieson and Roos, 2014). Однако отсутствие чёткого позитивного влияния протеазы при одновременном включении в корм фитаз и/или карбогидраз не согласуется с выводом более раннего анализа (Cowieson and Roos, 2014). Этот вывод не считаем противоречащим описанному анализу, поскольку в нём были обработаны результаты по действию различных протеаз (Lee et al., 2018) против одной (Cowieson and Roos, 2014). Увеличение числа протеаз, участвующих в испытаниях, и выборка за длительный период (с 1955 по 2017 год) невольно вели к росту вариабельности ответных реакций и снижению достоверности различий анализируемых результатов.

Протеазы различных продуцентов отличаются требованиями к условиям проявления максимальной активности. Независимо от происхождения нейтральные и кислые протеазы, добавленные в корм, в большинстве случаев угнетали аппетит и снижали живую массу к концу опыта. Детальное изучение кажущейся переваримости протеина в подвздошной кишке показало, что уровень протеина в рационе не влиял на этот показатель. Испытанные добавки протеаз разнонаправленно влияли на содержание аминокислот в подвздошной кишке. Прослеживалась тенденция к снижению потребления переваримых аланина, глицина, гистидина, глутаминовой кислоты, изолейцина, лейцина, пролина, тирозина триптофана, фенилаланина, и цистеина. Кислые протеазы меньше угнетали потребление переваренных аминокислот по сравнению с нейтральными. Анализ результатов настоящего исследования и обобщение данных литературы привёл авторов к заключению, что в пределах каждой группы нейтральных сериновых или кислых аспарагиновых эндогенных или промышленных протеаз существуют различия по их биологической активности, субстратной специфичности, требуемых оптимумах pH и температуры (Walk et al., 2018). Отсутствие положительного влияния протеазы на зоотехнические показатели в вышеописанном исследовании исследователи объясняют присутствием в кормах фитазы и ксиланазы (Lee et al., 2018), хотя скорее это было обусловлено снижением потребления отдельных аминокислот, в том числе незаменимых.

Угнетение потребления корма при добавлении к нему протеаз наблюдали в ряде экспериментов, хотя в других случаях отмечали его увеличение. Эти факты не следует считать противоречивыми и использовать для обоснования одной из точек зрения. Подобные результаты зависят от условий проведения экспериментов. Механизм этого действия остаётся невыясненным. Разная направленность реакций на действие протеазы подтверждена исследованиями на цыплятах, которым добавляли корма протеазу в условиях повышенной температуры, при которой и установили её разнонаправленное действие: потребление стартера снижалось с понижением в нём протеина (20,3%) и возрастало при использовании корма с его нормальным уровнем (21,4%). В прохладное время года потребление корма увеличилось на обоих рационах. Включение протеазы в корм во всех случаях улучшало рост цыплят (Yu et al., 2007).

Распространёно мнение о повышении переваримости питательных веществ с возрастом, которое не всегда подтверждается. Так, переваримость протеина бройлерами в комбикорме, включающем кукурузу и соевый шрот, на 14 день составила 81,6% и повысилась до 85,5% на 42 день, тогда как из рациона на основе пшеницы и рапсового шрота, на 14 день она составила 78,7% и снизилась до 75,8% на 42 день. При этом под влиянием протеазы переваримость протеина из кукурузно-соевого комбикорма возросла на 2,2% и 1,8% соответственно указанным возрастам. Прирост переваримости протеина из пшенично-рапсового рациона в 14 дней составил 3% и увеличился на 4% к 42 дню (Huang et al., 2005). Положительное действие кормовых протеаз связывают с их комплементарным действием к эндогенным протеазам, хотя этот факт подтверждается в экспериментах по изучению переваримости протеина, но он не всегда сопровождается повышением продуктивных показателей (Walk et al., 2018). Исходя из повышения переваримости протеина, были предприняты успешные попытки применения экзогенных протеаз на фоне скармливания птице и свиньям кормов с пониженным содержанием протеина (Cowie et al., 2017; Law et al., 2018; Morales et al., 2017; Wang et al., 2020).

При всём многообразии экзогенных протеаз, подавляющее большинство из них проявляют дополнительное действие к эндогенным (врождённым) ферментам, которых в какие-то периоды жизни или в каких-то условиях недостаточно для более полного переваривания протеина. Это подтверждается недавним изучением индивидуальной переваримости протеина соевого шрота из двух источников петушками Росс 308. Во время эксперимента источник соевого шрота и включение в рацион протеазы не оказывали влияния на потребление корма — это даёт основание считать, что наблюдаемые нижеуказанные различия были обусловлены изучаемыми факторами (Cowie et al., 2020). В ряде исследований установлено, что под действием добавляемых протеаз повышение переваренных аминокислот происходит не пропорционально их составу в исходном рационе, сбалансированному с потребностями организма (Cowie et al. and Roos, 2014), что ведёт к отклонениям в формуле «идеального» аминокислотного состава протеина.

Интересные результаты были получены при сравнительном изучении гидролиза соевого протеина двумя коммерческими протеазами, выделенными из *Bacillus amyloliquefaciens* (субтилизинового типа FNA) и из *Nocardopsis prasina* (химотрипсин подобная NPP),

а также свиным пепсином и панкреатином. Используемые методические подходы позволили выявить количество образующихся пептидов, их С-концевую аминокислоту и распределение по массе. Общее количество образующихся пептидов и их характеристики варьируются от протеазы к протеазе, а также зависели от соотношения соевый протеин:протеаза. Обработка полученных данных показала, что совместное применение экзогенных и эндогенных протеаз давало больший эффект, чем их использование порознь, и не было связано с фермент-субстратным отношением. Образовавшиеся в результате гидролиза пептиды отличались по составу. Среди продуктов гидролиза в пептидах доля цистина на месте концевой аминокислоты была очень низкой (Yu et al., 2020). Это свидетельствует о том, что испытанные экзогенные протеазы полностью не перекрывали спектр действия эндогенных протеаз и не обладали кератинолитической активностью. Экзогенные протеазы не только дополняли действие эндогенных ферментов при их недостатке, но и подвергали гидролизу те части белковой молекулы, которые недоступны для эндопептидаз животного. Под их действием образовывались пептиды, которые становились субстратами для эндогенных протеаз, то есть расширялась доступность субстратов для действия врождённых ферментов. Выявленная в описанном исследовании зависимость конечных продуктов гидролиза от соотношения субстрат:фермент, даёт основание полагать, что отклонения от рекомендуемых доз включения в корма экзогенных ферментов будет влиять на зоотехнические результаты.

Кератинызы и их субстраты

В практике птицеводства часто используют мясокостную и реже перьевую муку, произведённую из отходов, образующихся при убойе птицы. Её протеин, хотя и имеет животное происхождение, обладает низкой переваримостью, в связи с наличием в сырье значительного количества кератина, который практически не переваривается эндогенными протеазами. Кератин относится к группе структурных белков, входящих в состав эпидермиса кожи, пера, шерсти, копыт, которые действуют как защитный барьер для тканей от проникновения воды и инфекций, а также защищают их от механических воздействий. Основная масса этих белков представлена α - и β -кератинами, из которых первые наиболее изученные имеют молекулярную массу в диапазоне 60–80 кДа с низким содержанием дисульфидных групп. Вторые составляют основу ороговевшего эпителия и имеют пластинчатую структуру, их молекулярная масса 10–22 кДа. Названные два типа кератинов в свою очередь подразделяют на кислые и нейтральные, мягкие и твердые, то есть они не однородны. Известен γ -кератин, представленный глобулярным белком с молекулярной массой около 15 кДа и отличающийся высоким содержанием серы (Sinkiewicz et al., 2018; Wang et al., 2016). В перьях преобладают β -кератины (Fraser and Parry, 2008; Korniłowicz-Kowalska and Bohacz, 2011). Изучение переваримости перьевой муки, подвергнутой термической обработке при давлении 3,5 бара, показало, что она была низкой, составляя в среднем около 50% против 85% белка соевых бобов. Доля отдельных переваренных аминокислот была в диапазоне 20–70%, особенно низкий уровень отмечен у лизина, гистидина, глутаминовой кислоты и цистина (Bielorai et al., 1983). Для повышения эффективности использования убойных отходов в кормлении их обрабатывают термическим и термохимическим методами. Эти методы применяют давно,

хотя они недостаточно повышают переваримость и их использованием в основном решают зооигиенические проблемы. В процессе обработки происходит неконтролируемое разрушение метионина, триптофана, аспарагиновой и глутаминовой кислот (Слепнева и Хамматова, 2014). Анализ продуктов, производимых разными способами, показал, что по концентрации в них важнейших аминокислот они могут отличаться почти в два раза. Количество доступных аминокислот и пептидов в продуктах гидролиза зависит от применяемых методов и условий их проведения. Анализ 19 образцов мясокостной муки, полученных из разных промышленных предприятий по переработке птицы, показал, что её состав был крайне нестабилен: содержание сырого протеина находилось в пределах 38,5–67,2%, сырого жира 4,3–15,3% и золы 13,0–56,5%. Существенно различались качество протеина, концентрация аминокислот и их переваримость. Во всех случаях основным белком является коллаген, который входит в состав костей, соединительных тканей, хрящей и сухожилий. В нём не хватает большинства незаменимых аминокислот, и они плохо перевариваются. Не удалось установить простых лабораторных тестов, которые бы отражали качество различных партий мясокостной муки. Метод определения переваримости протеина *in vitro* с использованием 0,2% пепсина (АОАС (1990) оказался неудовлетворительным для прогнозирования его переваримости *in vivo* (Ravindran et al., 2002). Заметим, что согласно ГОСТу Р 55987-2014, для определения переваримости протеина перьевой муки тоже предусматривается использование 0,2%-го раствора пепсина, что будет приводить к некорректным данным.

Состав перьевой муки отличается большей стабильностью в сравнении с мясокостной мукой, однако её протеин без предварительной обработки у моногастричных животных практически не переваривается. Для расщепления кератина необходимо применение протеаз, относящихся к группе кератиназ (Е.С. 3.4.99.11), которые продуцируются многими бактериями, актиноциетапами и грибами. Кератиназы являются преимущественно внеклеточными сериновыми или металло-сериновыми протеазами (Onifade et al., 1998; Gradisar et al., 2005; Brandelli, 2008; Bohacz et al., 2020). Они обладают широкой субстратной специфичностью с оптимумом действия в диапазоне pH 3–9. Главным их преимуществом является способность связываться с нерастворимыми субстратами и расщеплять дисульфидные связи, которые неподатливы действию протеаз других групп (Qiu et al., 2020). Кератиназы способны расщеплять белки растительного и животного происхождения (Lin et al., 1996; Gradišar et al., 2005).

Впервые кератиназу выделили и очистили из культуры *Bacillus licheniformis* PWD-1 (Williams et al., 1990). Лабораторное изучение кератиназ, продуцируемых *P. Marquandii*, *D. microsporus* и протеазы-К показало, что они обладали различной активностью, при этом кератинолитические ферменты проявляли значительно большую активность в отношении кератина, по сравнению с субтилизином, трипсином, химотрипсином, эластазой или коллагеназой (Gradišar et al., 2005).

Изначально предполагали, что кератиназа состоит из двух ферментов: протеин-дисульфидредуктазы и пептидогидролазы. Однако позднее нашли доказательства, что ранее описанные кератиназы являются отдельными ферментами, которые действуют синергически с дисульфидредуктазами или восстанавливающими агентами (Lange et al., 2016; Grumbt et al., 2013). Истин-

ные кератиназы не зависят от восстановителей или присутствия дисульфидредуктазной активности (Navone and Speight, 2018). Это подтверждается изучением коммерческого ферментного препарата Cibenza DP100, который не подвергал заметному перевариванию сырьё, содержащее кератин, до добавления в среду (*in vitro*) восстанавливающего агента (Navone and Speight, 2018), то есть в нём отсутствует истинная кератиназа. Препарат Cibenza DP100 не является чистым ферментом — он состоит из ферментационных растворов *B. licheniformis* PWD-1, содержащих KerA, — кератиназу субтилизинового типа (Wang et al., 2011), но в нём отсутствуют живые клетки, способные образовывать сульфит. Первой очищенной и охарактеризованной кератиназой была KerA из штамма *Bacillus licheniformis*, которая является субтилизиноподобной протеазой, принадлежащей к семейству сериновых протеаз S8 (Lin et al., 1992). Возможно, протеазы субтилизинового типа обладают некоторой активностью в отношении кератина, но истинная кератиназа не должна зависеть от присутствия восстанавливающих агентов или дисульфидредуктазы. Сравнительное изучение коммерческих продуктов Cibenza DP100 и Ronozyme ProAct, позволило установить, что Ronozyme ProAct обладает большей способностью при разложении кератина (Navone and Speight, 2018).

Выявлено лишь небольшое количество кератиназ, которое соответствует этим требованиям (Huang et al., 2015). Несмотря на прогресс в изучении механизма действия кератиназ, требуются дополнительные исследования для изучения ферментов, разлагающих кератин (Li, 2019).

При выборе препаратов для использования в качестве кормовых добавок необходимо учитывать, что некоторые из них требуют присутствия восстанавливающих химических веществ, применение которых можно использовать только *in vitro*. Этот приём будет приемлем для гидролиза пера до включения его в корм. Преимущество кератиназ перед другими протеазами заключается в том, что они проявляют активность в широком диапазоне pH и, таким образом, могут действовать во всех отделах ЖКТ, переваривая многие растворимые и нерастворимые белки (Brandelli et al., 2010). Большинство кератиназ, кроме кератина, расщепляют такие трудно переваримые субстраты, как коллаген и эластин (Yu et al., 1969; Suzuki et al., 2006). Следует обратить внимание, что при действии кератиназ в зависимости от источника кератина и специфики фермента образуются пептиды различного состава, обладающие противомикробным, противовоспалительным, антиоксидантным, противодиабетическим действиями (Еремеев и др., 2009; Sundaram et al., 2015; Kelly et al., 2007; Fontoura et al., 2014).

Изучение действия кератинолитических штаммов, *B. cereus* и *B. polymyxa*, на перо кур, страуса, свиную щетину, шерсть ягненка, человеческие волосы и роговой слой эпидермиса, показало, что кератиназы активнее разлагали β -кератины пера, по сравнению α -кератинами. Кератиназы обоих штаммов проявляли разную протеолитическую активность на испытанных субстратах, демонстрируя относительную специфичность (Laba and Szczekala, 2013; Avdiyuk and Varbanets, 2019; Qiu et al., 2020). Энзиматический гидролиз пера сопровождался образованием продуктов с молекулярной массой от 0,23 до 14,6 кДа (Еремеев и др. 2009). Естественно, что при таком разбросе по массе отдельные вещества, присутствующие в гидролизате, будут отличаться по свойствам.

Любой метод обработки пера сопровождается присутствием некоторого количества продуктов неполного гидролиза, которые могут не перевариваться животными, поэтому содержание доступных аминокислот всегда ниже их общего содержания. Разница зависит от состава исходного сырья и режимов гидролиза. Это позволяет ожидать образование конечных продуктов, обладающих различной биологической активностью. Всасывание отдельных аминокислот из перьевой муки могло составлять 20–70% по сравнению с соевым протеином (Bielorai et al., 1983). При тестировании гидролизатов, полученных после действия на перьевую муку экспериментальных кератиназ K6FM, K82FM и коммерческого ферментного препарата CMFM, установили, что *in vitro* под действием пепсина лучше переваривался гидролизат, полученный в результате использования CMFM (Eaksuree et al., 2016). После инкубации перьевой муки с кератиназами, продуцированными *Bacillus sps.* штаммами: MBF11, MBF20, MBF21 или MBF45, её переваримость *in vitro* повысилась до 61–72%, тогда как после термообработки она составляла только 27–32% (Lakshmi and Lakshmi, 2015).

Применение протеаз при обработке пера до его скармливания не всегда оказываются эффективными. Так, ферментативный гидролиз в присутствии Cibenza IDN900 не повлиял на растворимость сухого вещества, pH или переваримость пепсином *in vitro*; препарат NovoProD лишь незначительно улучшил названные параметры (Alder et al., 2018). Известны десятки продуцентов кератиназ, в некоторых случаях из них выделены и охарактеризованы чистые ферменты. Однако остаются трудности в оценке свойств кератиназ, которые сопряжены с отсутствием одинаковых методов анализа, позволяющим проводить их сравнение. В связи с широкой субстратной специфичностью трудно определить индивидуальные особенности кератиназ.

В экспериментах на бройлерах установлено, что гидролизат пера, полученный в результате действия кератиназы, может заменять до 5–7% протеина соевого шрота (Carter, 1998; Larasati et al., 2017). Это подтверждает возможность использования ферментативных гидролизатов пера в составе кормов для птицы, однако его гидролиз до включения в корм вызывает необходимость ряда дополнительных технологических воздействий, которые включают использование технологического оборудования для проведения ферментации, создание требуемого гидромодуля, удаление воды после завершения гидролиза. В результате повышается стоимость производимых продуктов. Упрощение технологии производства кормов и снижения их стоимости возможно в результате прямого включения препаратов кератиназы в корма, содержащие перо (Gupta and Ramnani, 2006). Дополнительным поводом к использованию кератиназ в составе кормов, как отмечалось выше, является их более широкая субстратная специфичность по сравнению с обычными протеазами, а также способность расщеплять дисульфидные связи у других белков кроме кератина, в том числе и растительного происхождения. Кератиназа не подвергается денатурации и не теряет активности в ЖКТ бройлеров (Wang, 2007), что создаёт возможность её прямого включения в состав комбикормов.

Влияние протеаз на белки растительного происхождения

В мировом аспекте соя является основным источником протеина в кормах для животных. Её протеин легко переваривается и усваивается, однако в его составе

содержатся глобулины, лектины (агглютинины) и ингибиторы протеаз, глицинин и β -конглицинин (гликопротеин), которые устойчивы к действию ферментов ЖКТ, особенно у молодняка животных и птиц и проявляют антипитательное действие (Clemente et al., 2008; Moreno and Clemente, 2008). Для предупреждения действия антипитательных факторов распространение получила термическая обработка соевых бобов или соевого шрота, однако наряду с инактивацией ингибиторов, она сопровождается негативными изменениями качества протеина. Последние исследования показали, что скармливание цыплятам термически обработанного шрота вызывало рост концентрации реактивного кислорода, малонового диальдегида в тощей кишке, печени и плазме и одновременно снижалась активность супероксиддисмутазы и содержания восстановленного глутатиона (Lu et al., 2019). Изменение этих параметров свидетельствует о нарушениях в обмене веществ, которые сопровождались снижением прироста живой массы.

Традиционно большее внимание уделяют ингибиторам трипсина и химотрипсина, на которые приходится до 7–9% от массы белка сои (Penha et al., 2007). Существует два типа ингибиторов: ингибитор трипсина Кунитца, который легко инактивируется при термообработке и ингибитор химотрипсина Боумана-Бирка — устойчивый к действию высокой температуры (Miura et al., 2005; Monteiro et al., 2004). Текущие исследования показывают, что существует реальный риск угнетения переваримости протеина соевого шрота (Chen et al., 2020). Известно, что растительная цистеиновая протеаза вызывает расщепление ингибиторов трипсина и химотрипсина (Куница и Боумана-Бирка) и β -конглицинина сои (Papadoitsis and Wilson, 1991). Предварительная обработка соевого шрота субтилизин-протеазой *B. subtilis* так же снижала содержание в нём ингибиторов трипсина (Caine et al., 1998). Несмотря на то, что ингибиторы трипсина угнетают переваримость белка, они не влияли на действие экзогенной протеазы (Aderibigbe et al., 2020).

Известные ингибиторы протеаз являются белковыми соединениями, поэтому для их инактивации могут применяться протеазы, которые в отличие от физико-химических методов, не проявляют негативного действия на питательные свойства протеина. Глицинин и β -конглицинин входят в глобулиновую фракцию соевого белка, на долю каждого приходится по 30–40% (Sun et al., 2007). Они являются иммуногенными, нарушающими структуру и иммунную функцию кишечника у поросят после отъёма (Yoo et al., 2009), а так же пищеварение в целом. Скармливание поросятам после отъёма кормов, содержащих соевые белки, сопровождалось аллергией с повышением концентрации цитокинов. Цистеин входит в состав полипептидных цепей глицинина и β -конглицинина, которые связаны между собой дисульфидными связями (Fukushima, 2011). В эксперименте при включении в корм поросятам-отъёмышам 2%, 4% и 8% глицинина наблюдали рост случаев диареи, концентрации иммуноглобулина E ($P < 0,05$). Индуцированная гиперчувствительность выражалась иммунным ответом типа Th2, опосредованным IgE и связанным с увеличением количества тучных клеток кишечника и высвобождением гистамина, а также ростом концентрации IL-4 и IL-10 в сыворотке крови; наблюдалось снижение продуктивности (Sun et al., 2008a). Поиски способов преодоления негативного действия ингибиторов трипсина, лектина и глицинина позволили установить, что кислая протеаза расщепляла названные белки, но не действо-

вала на лектины; щелочная протеаза оказалась неактивной (Hessing et al., 1996). Лектины сои более стабильны по сравнению с лектинами других бобовых; их молекулы содержат мало цистеина и метионина, но отличаются высоким содержанием 4-гидроксипролина и других гидроксиаминокислот, что придаёт им устойчивость при переваривании.

В исследованиях *in vitro* кератиназа, продуцируемая *Bacillus licheniformis* PWD-1, активно подвергала гидролиз глицинин и β -конглицинин (Wang et al. 2011). Это наблюдения дали основание предполагать, что добавление к корму экзогенной протеазы может увеличить переваримость протеина и предупредить воспалительные иммунные реакции в кишечнике, что в дальнейшем было подтверждено в исследованиях при скормливание поросётам-отъёмышам корма, включавшего протеазу PRO (Lee et al. 2020). Изучение кажушейся и стандартизированной переваримости протеина рисовых отрубей, арахисового, рапсового и хлопкового шротов, продуктов ферментации кукурузы и кукурузно-соевого комбикорма под влиянием протеазы Cibenza DP100 у поросят показало, что повышение доли переваренного протеина не зависели от его концентрации в корме. Выявлены существенные различия в количестве переваренных аминокислот, что может объяснять различное влияние протеазы в связи с использованием различных источников протеина (Huang et al., 2018).

В одной из первых работ по изучению влияния добавок кератиназы в кукурузно-соевый рацион, испытывали действие фермента, продуцируемого *B. Licheniformis* PWD-1. Птица опытных групп получала корма, содержавшие 21,4%, или 18% сырого протеина. В рацион с пониженным уровнем протеина включали 0,05, 0,10, или 0,15% ферментного препарата. Живая масса цыплят в 21-дневном возрасте, получавших корм с добавкой фермента была выше, чем в контрольной группе и при включении в корм 0,1% кератиназы она приблизилась к массе цыплят, потреблявших корм с 21,4% протеина; достоверно снижался расход корма на привес (1-й опыт). В следующем опыте в корм с высоким и низким уровнем протеина добавляли 0,10% кератиназы PWD-1. Добавка фермента к рациону, содержащему 21,4% протеина, повысила живую массу на 10,4% и при пониженном содержании протеина, — на 4,3% (Odetallah et al., 2003). Улучшение эффективности использования и роста цыплят корма было показано при использовании другой кератиназы — Versazyme (VZ) путем включения её в корм из расчёта 0,05 или 0,1%. В опыте уровень протеина (и доступных аминокислот) в рационах составлял 95, 100 и 105% от рекомендуемых норм потребности. Бройлеры, получавшие корм без фермента, лучше росли на рационе с повышенным уровнем протеина (стартер — 23%, гроуэр — 21% и финишер — 18%). На фоне испытанных уровней протеина кератиназа улучшала рост, но в отличие от предыдущего исследования, большее относительное увеличение живой массы к концу выращивания наблюдали у цыплят, получавших корма с пониженным содержанием протеина ($P < 0,01$); улучшалась эффективность использования корма и выход мяса грудки (Wang et al., 2006).

Включение кератиназы *Bacillus licheniformis* PWD-1 в корм для поросят в дозе 0,05% сопровождалось нормализацией морфологии слизистой оболочки кишечника и микробиома, что приводило к увеличению общей переваримости сухого вещества, энергии, сырого протеина и фосфора ($P < 0,05$), повышению прироста живой массы и улучшению конверсии корма ($P < 0,05$), при

незначительном снижении потребления корма (Wang et al., 2011). Положительное влияние протеазы на продуктивность бройлеров наблюдали при скормливание цыплятам кормов, включавших силаназу и фитазу. Добавление в корм протеазы RONOZYME ProAct привело к увеличению продуктивности, переваримости протеина и чистой энергии корма. Авторы указывают, что положительное влияние протеазы выходило за рамки влияния на обмен белка и аминокислот. В частности, установлена активация генов, ответственных за транспорт пептидов и переваривание крахмала (Cowieson et al., 2019).

В последние годы внимание с изучения влияния протеаз на переваримость переключилось к её «экстрапротеиновым», или «внебелковым» эффектам, включая повышение переваримости липидов и крахмала, здоровье кишечника, и стабильность микробиома, однородность поголовья в стаде, и сокращение выделения азота и других веществ с помётом. Эти действия протеаз прямо не связаны с их функциями, в последнее время становятся важными мотиваторами для использования ферментов (Cowieson and Roos, 2016). Гидролиз лектинов и глицининов не только повышает долю доступных аминокислот, но и ведёт к предупреждению действия антигенных белков, что также способствует поддержанию в нормальном состоянии слизистой оболочки кишечника и здоровья в целом (Cowieson and Roos, 2014). Экзогенные протеазы повышали прочность кишечника на разрыв и высоту микроворсинок у поросят-отъёмышей (Zuo et al., 2015; Wang et al., 2008). Имеются указания, что потребление корма, содержавшего протеазу, привело к уменьшению прикрепления энтеротоксигенных *E. coli* к стенке кишечника и снижению случаев диареи и сопутствующим отходом поголовья (Mynott et al., 1991, 1996).

Заключение

В зоотехнических опытах изучение действия протеаз ограничивается учётом переваримости протеина, продуктивности и эффективности использования корма, при этом механизмы связей протеаз с другими процессами остаются невыясненными. Обычно не принимается во внимание, что повышению переваримости протеина сопутствует непропорциональный рост доступности отдельных аминокислот, что изменяет баланс «идеального» аминокислотного состава протеина и ожидаемую эффективность. Вышеперечисленное ограничивает целенаправленный выбор и применение протеаз и ведёт к получению нестабильных результатов.

Оценка протеаз и кератиназ, в частности, представляет проблему даже в научных лабораториях. Проблема обусловлена отсутствием «стандартизированных» или общепринятых условий анализа, которые затрудняют сравнение протеаз и выявление истинных кератиназ. Количество секвенированных протеаз ограничено (к 2020 году), поэтому их трудно идентифицировать. Изучение протеаз проводят в разных условиях, что исключает возможность их сравнения. В связи с широкой субстратной специфичностью кератиназ часто трудно определить: являются ли изучаемые протеазы истинными кератиназами, или предварительная обработка субстрата и состав среды создают условия для проявления кератинолитического действия. Направление по изучению кератиназ сравнительно новое и активно развивается последнее десятилетие, однако коммерческие структуры, используя первые успехи и рекламу, выводят на рынок недостаточно проверенные препараты, поэтому неясно, какие из них себя оправдают.

Изучение действия протеаз даёт нестабильные результаты, как и другие ферменты: карбогидразы, фитазы и т.д. Это связано с различными свойствами самих ферментных препаратов и составов рационов, на фоне которых они испытываются. В большинстве случаев при разработке плана исследований не учитывается соответствие выбранного фермента составу субстрата. Одна и та же протеаза показывает разную эффективность на фоне разных рационов. То есть дело не в протеазе, а в свойствах белков. С другой стороны, испытание разных протеаз на фоне одного рациона тоже даёт разные результаты — это подтверждает разные свойства протеаз.

Нестабильные результаты заявленного действия монопротеаз связаны с тем, что в одну группу ферментов с одинаковой направленностью действия попадают ферменты, которые отличаются по специфичности и по усло-

виям, требуемым для проявления максимальной активности. В практических условиях широта специфичности субстратов и их соотношения неисчислимо больше того количества субстратов, которые были использованы в научных исследованиях. Взаимодействие ферментов с субстратами кормов осложняется многими факторами и несравнима с теми условиями, в которых изучают их действие на чистые субстраты, поэтому прогнозировать действие ферментов на продуктивность сложно.

При выборе протеаз потребителям можно рекомендовать кератиназы, так как у них значительно шире субстратная специфичность по сравнению с обычными протеазами, и они проявляют активность в широком диапазоне pH, то есть способны действовать на протяжении всего ЖКТ. Эффективность любого кормового фермента можно определить только в испытаниях на животных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- ГОСТ Р 55987-2014 Корма, комбикормовое сырье. Метод определения переваримости муки из гидролизованного пера *in vitro* (Переиздание). [GOST R 55987-2014 Feed, compound feed raw materials. Method for *in vitro* determination of the digestibility of hydrolyzed feather flour (Reprinted) (In Russ.)]
- Еремеев, Н.Л., Николаев И.В., Керученко И.Д., Степанова Е.В., Сатрутдинов А.Д., Зиновьев С.В., Исмаилова Д.Ю., Хотченков Н.В., Синицин А.П., Волик В.Г., Королёва О.В. Ферментный гидролиз кератинсодержащего сырья для получения белковых гидролизатов. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2009;45(6):717-724. [Eremeev, N.L., Nikolaev I.V., Keruchenko I.D., Stepanova E.V., Satrutdinov A.D., Zinoviev S.V., Ismailova D.Yu., Hotchenkov N.V., Sinitin A.P., Volik V.G., Koroleva O.V. Enzymatic hydrolysis of keratin-containing raw materials to obtain protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009;45(6):717-724. (In Russ.)]
- Слепнева, Е.В., Хамматова В.В. Влияние химических реагентов на кератин шерстяных волокон. *Вестник Казанского технологического университета*. 2014;17(16):73-75. [Slepneva, E.V., Khammatova V.V. The influence of chemical reagents on the keratin of wool fibers. *Bulletin of Kazan Technological University*. 2014;17(16):73-75. (In Russ.)]
- Aderibigbe A., Cowieson A. J., Sorbara J. O., Pappenberger G. and Adeola O. Growth performance and amino acid digestibility responses of broiler chickens fed diets containing purified soybean trypsin inhibitor and supplemented with a monocomponent protease. *Poultry Science*. 2020;(99):5007.
- Adler S. A., Slizyte R., Honkapää K. and Løes A-K. *In vitro* pepsin digestibility and amino acid composition in soluble and residual fractions of hydrolyzed chicken feathers. *Poultry Science*. 2018;(97):3343-3357.
- AOAC (1990) 'Official methods of analysis.' 15th edn (Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA)
- Avdiyuk K.V., Varbanets L.D. Keratinolytic enzymes: producers, physical and chemical properties, application for biotechnology. *Biotechnologia Acta*. 2019;12(2):27-45.
- Bielorai R., Harduf Z., Iosif B., Alumot E. Apparent amino acid absorption from feather meal by chicks. *The British Journal of Nutrition*. 1983;(49):395-399
- Bohacz J., Korniłowicz-Kowalska T., Kitowski I., Ciesielska A. Degradation of chicken feathers by *Aphanoascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect. *Int. Biodeterioration and Biodegradation*. 2020;(151):104968. DOI:10.1016/j.ibiod.2020.104968
- Brandelli A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioproc. Technol*. 2008;(1):105-116.
- Brandelli A., Daroit D.J., Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2010;(85):1735-1750.
- Caine W.R., Verstegen M.W.A., Sauer W.C., Tamminga S., Schulze H. Effect of protease treatment of soybean meal on content of total soluble matter and crude protein and level of soybean trypsin inhibitors. *Anim. Feed Sci. Technol*. 1998;(71):177-183.
- Carter S.D. Bacterial Keratinase: Assay development and nutritional application. North Carolina State University, Raleigh. Ph.D. Thesis. 1998. 92 p.
- Castanon J.I.R., Marquardt R.R. Effect of enzyme addition, autoclave treatment and fermenting on the nutritive value of field beans (*Vicia faba* L.). *Animal Feed Sci. Technol*. 1989;(26):71-79.
- Chen J., Wedekind K., Vazquez-Anon M. Trypsin inhibitor and urease activity of soybean meal products from different countries and impact of trypsin inhibitor on ileal amino digestibility in pigs. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2020;97(10):1151-1160.
- Clarke E., Wiseman J. Effects of variability in trypsin inhibitor content of soya bean meals on true and apparent ileal digestibility of amino acids and pancreas size in broiler chicks. *Anim. Feed Sci. Technol*. 2005;(121):125-138.
- Clemente A., Jimenez E., Marin-Manzano M.C. Rubio L.A. Active Bowman-Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. *J. Sci. Food Agric*. 2008;(88):513-521.
- Cowieson A.J., Bhuiyan M.M., Sorbara J.O.B., Pappenberger G., Pedersen M.B., Choct M. Contribution of individual broilers to variation in amino acid digestibility in soybean meal and the efficacy of an exogenous monocomponent protease. *Poultry Sci*. 2020;(99):1075-1083.
- Cowieson A.J., Toghyani M., Kheravii S.K., Wu S.-B., Romero L.F., Choct M. A mono-component microbial protease improves performance, net energy, and digestibility of amino acids and starch, and up-regulates jejuna expression of genes responsible for peptide transport in broilers fed corn/wheat-based diets supplemented with xylanase and phytase. *Poultry Sci*. 2019;(98):1321-1332.
- Cowieson A.J., Roos F.F. Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 2016;(221):331-340.
- Cowieson A.J., Zaefarian F., Knap I., Ravindran V. Interactive effects of dietary protein concentration, a mono-component exogenous protease and ascorbic acid on broiler performance, nutritional status and gut health. *Anim. Prod. Sci*. 2017;(57):1058-1068
- Cowieson A.J., Lu H., Ajuwon K., Knap I., Adeola O. Interactive effects of dietary protein source and exogenous protease on growth performance, immune competence and jejunal health of broiler chickens. *Anim. Prod. Sci*. 2015;(57):252-261.
- Cowieson A.J., Roos F.F. Bioefficacy of a mono-component protease in the diets of pigs and poultry: a meta-analysis of effect on ileal amino acid digestibility. *Journal of Applied Animal Nutrition*. 2014;(2):13-21.
- Eaksuree W., Prachayakitti A., Upathanpreecha T., Taharnklaew R., Nitisinprasert S., Keawsompong S. *In vitro* and *in vivo* evaluation of protein quality of enzymatic treated feather meals. *SpringerPlus*. 2016;(5):971-977.
- Fontoura R., Daroit D.J., Correa A.P.F., Meira S.M.M., Mosquera M., Brandelli A. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-1 converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IVinhibitory activities. *New Biotechnol*. 2014;(31):506-513.
- Fraser R.B., Parry D.A. Molecular packing in the feather keratin filament. *J. Struct. Biol*. 2008;(162):1-13.

27. Fukushima D. Soy proteins. In: Handbook of Food Proteins, Eds: Phillips G and Williams P. print: Woodhead Publishing. 2011. 464 p.
28. Gradišar H., Friedrich J., Krizaj I., Jerala R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microspores* to some known proteases. *Appl Environ Microbiol.* 2005;(71):3420–3426
29. Grumbt M., Monod M., Yamada T., Hertweck C., Kunert J., Staib P. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *J. Invest. Dermatol.* 2013;(133):1550–1555.
30. Gupta R., Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006;(70):21–33.
31. Hessing G.C., van Laarhoven H., Rooke J.A., Morgan A. Quality of soyabean meals (SBM) and effect of microbial enzymes in degrading soya antinutritional compounds (ANC). In: 2nd International Soyabean Processing and Utilization Conference, 1996. Bangkok, Thailand, p. 8-13.
32. Huang K.H., Ravindran V., Li X. and Bryden W.L. Influence of age on the apparent ileal amino acid digestibility of feed ingredients for broiler chickens. *British Poultry Science*, 2005;(46):236–245.
33. Huang Y., Busk P.K., Herbst F.A., Lange L. Genome and secretome analyses provide insights into keratin decomposition by novel proteases from the non-pathogenic fungus *Onygena corvina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015;(99):9635–9649.
34. Huang C., Ma D., Zang J., Zhang B., Sun B., Liu L., and Zhang S. Effect of keratinase on ileal amino acid digestibility in five feedstuffs fed to growing pigs. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2018;(31):1946–1955.
35. Kelly R., Ellis G., Macdonald R., McPherson R., Middlewood P., Nuthall M., Rao G.-F., RoddickLanzilotta A., Sigurjonsson G., Singleton D. Keratin and Soluble Derivatives for a Nutraceutical and to Reduce Oxidative Stress and to Reduce Inflammation and to Promote Skin Health. U.S. Patent 0065506, 22 March 2007.
36. Kornilowicz-Kowalska T., Bohacz J. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste Manag.* 2011;(31):1689–1701.
37. Laba W., Szczekala K.B. Keratinolytic proteases in biodegradation of pretreated feathers. *Polish J. Environ. Stud.* 2013;(22):1101–1109
38. Lange L., Huang Y., Busk P.K. Microbial decomposition of keratin in nature—a new hypothesis of industrial relevance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;(100):2083–2096.
39. Lakshmi P.J., Lakshmi V.V. Enhancement in nutritive value and in vitro digestibility of keratinase treated feather meal. *Intern. J. Scientific and Engineering Research.* 2015;6(2):36–40.
40. Larasati, D., Tsurayaya, N., Koentjoro, M.P., Prasetyo, E.N. Keratinase from newly isolated strain of thermophilic *Bacillus* for chicken feed modification. *AIP Conf. Proc.* 2017. P.1854.
41. Law F.L., Zulkifli I., Soleimani A.F., Liang J.B., Awad E.A. The effects of low-protein diets and protease supplementation on broiler chickens in a hot and humid tropical environment. *Asian-australas J. Anim. Sci.* 2018;(31):1291–1300.
42. Lee S.A., Bedford M.R., Walk C.L. Meta-analysis: Explicit value of mono-component proteases in monogastric diets. *Poultry Sci.* 2018;(97):2078–2085.
43. Lee J.J., Kang J., Park S., Cho J.H., Oh S., Park D.J., Perez-Maldonado R., Cho J.Y., Park I.H., Kim H.B., Song M. Effects of dietary protease on immune responses of weaned pigs. *J. Anim. Sci. Technol.* 2020;(62):174–179.
44. Lewis C.J., Catron D.V., Liu C.H., Speer V.C., Ashton G.C. Enzyme supplementation of baby pig diets. *Agric. Food Chem.* 1955;(3):1047–1050.
45. Li Q. Progress in Microbial Degradation of Feather Waste. *Front Microbiol.* 2019. 10:2717. doi:10.3389/fmicb.2019.02717.
46. Lin X., Shih J.C.H., Swaisgood H.E. Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;(62):4273–4275.
47. Lin X., Lee C.-G., Casale E.S., Shih J.C. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl Environ Microbiol.* 1992;(58):3271–3275.
48. López-Otín C., Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 2008;(283):30433–30437.
49. Lu P., Xue W.Y., Zhang X.L., Wu D.W., Ding L.R., Wen C., Zhou Y.M. Heat-induced protein oxidation of soybean meal impairs growth performance and antioxidant status of broilers. *Poultry Science.* 2019;(98):276–286.
50. Miura E.M.Y., Ferreira Da Silva R.S.D.S., Mizubuti I.Y., Ida, E.I. Cinética de Inativação de Inibidores de Tripsina e de Insolubilização de Proteínas de Diferentes Cultivares de Soja. *Revista brasileira de zootecnia.* 2005;(34):1659–1665.
51. Moers K., Celus I., Brijs K., Courtin C.M. and Delcour J.A. Endoxylanase substrate selectivity determines degradation of wheat water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. *Carbohydrate Research.* 2005;(340):1319–1327.
52. Monteiro M. R. P., Costa N. M. B., Oliveira M. G. D. A., Pires C. V., and Moreira M. A. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. *Revista de Nutrição.* 2004;17(2):195–205.
53. Morales A., Buenabad L., Castillo G., Vazquez L., Espinoza S., Htoo J.K., Cervantes M. Dietary levels of protein and free amino acids affect pancreatic proteases activities, amino acids transporters expression and serum amino acid concentrations in starter pigs *J. Anim. Physiol.* 2017;(101):723–732.
54. Moreno F.J., Clemente A. 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens? *Open Biochem. J.* 2008;(2):11–23
55. Mynott T.L., Chandler D.S., Luke R.K.J. Efficacy of enteric-coated protease in preventing attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* and diarrheal disease in the RITARD model. *Infect. Immun.* 1991;(59):3708–3714.
56. Mynott T.L., Luke R.K., Chandler D.S. Oral administration of protease inhibits enterotoxigenic *Escherichia coli* receptor activity in piglet small intestine. *Gut.* 1996;(38):28–32.
57. Navone L., Speight R. Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases. *PLoS ONE.* 2018;(13):1–21.
58. Odetallah N.H., Wang J.J., Garlich J.D., Shih J.C.H. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poult Science.* 2003;(82):664–670.
59. Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam A.A., Al-Zarban S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresour. Technol.* 1998;(66):1–11.
60. Papastoitis G., Wilson K.A. Initiation of the Degradation of the Soybean Kunitz and Bowman-Birk Trypsin Inhibitors by a Cysteine Protease. *Plant Physiol.* 1991;(96):1086–1092.
61. Qiu J., Wilkens C., Barrett K., Meyer A. S. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechnology Advances.* 2020;(44):1–22.
62. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and molecular biology reviews.* 1998;(62):597–635.
63. Ravindran V., Hendriks W.H, Camden B.J, Thomas D.V., Morel P.C.H., Butts C.A. Amino acid digestibility of meat and bone meals for broiler chickens. *Aust. J. Agric. Res.* 2002;(53):1257–1264.
64. Razaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. Microbial Proteases Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;12(7):110.
65. Singh R., Mittal A., Kumar M., Mehta P. K. Microbial Proteases in Commercial Applications. *J Pharm Chem Biol. Sci.* 2016;(4):365–374.
66. Sinkiewicz I., Staroszczyk H., Sliwinska A. Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates. *J. Food Biochem.* 2018;(42):e12494.
67. Sun P., Li D.F., Li Z.J., Dong B., Wang F.L. Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine. *J. Nutr. Biochem.* 2007;(19):627–633.
68. Sun P., Li D., Dong D., Qiao S., Ma X. Effects of soybean glycinin on performance and immune function in early weaned pigs. *Archives of Animal Nutrition.* 2008;62(4):313–321.
69. Sundaram M., Legadavi R., Banu N.A., Gayathri V., Palanisamy A. A study of antibacterial activity of keratin nanoparticles from chicken feather waste against *Staphylococcus aureus* (Bovine mastitis bacteria) and its antioxidant activity. *Eur. J. Biotechnol. Biosci.* 2015;(6):1–5.
70. Suzuki Y., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 2006;(102):73–81.
71. Walk C.L., Pirgozliev V., Juntunen K., Paloheimo M., Ledoux D.R. Evaluation of novel protease enzymes on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in poultry: enzyme screening. *Poultry Sci.* 2018;(97):2123–2138.
72. Wang B., Yang W., McKittrick J., Meyers M.A. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts of bioinspiration. *Prog. Mater. Sci.* 2016;(76):229–318.
73. Wang D., Piao X.S., Zeng Z.K., Lu T., Zhang Q., Li P.F., Xue L.F., Kim S.W. Effects of Keratinase on Performance, Nutrient Utilization,

Intestinal Morphology, Intestinal Ecology and Inflammatory Response of Weaned Piglets Fed Diets with Different Levels of Crude Protein. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2011;(24):1718-1728.

74. Wang, H., Guo, Y., Shih, J.C.H. Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2008;(140):376-384.

75. Wang J.J., Garlich J.D., Shih J.C.H. Beneficial effects of versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. *J Appl Poult Res.* 2006;(15):544-550.

76. Wang Q.D., Zhang K.Y., Zhang Y., Bai S.P., Wang J.P., Peng H.W., Tian G., Xuan Y., Su Z.W., Zeng Q.F. Effects of dietary protein levels and protease supplementation on growth performance, carcass traits, meat quality, and standardized ileal digestibility of amino acid in Pekin ducks fed a complex diet. *Poultry Sci.* 2020;(99):3557-3566.

77. Williams C.M., Richter C.S., Mackenzie J.M., jr., Shih J.C.H. Isolation, Identification, and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium. *Applied and environmental microbiology.*

1990;(56):1509-1515.

78. Yoo J.S., Jang H.D., Lee J.H., Kim I.H. Effect of fermented soy bean protein on nitrogen balance and apparent fecal and ileal digestibility in weaned pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2009;(22):1167-1173.

79. Yu B., Wu S.T., Liu C.C., Gauthier R., Chioua P.W.S. Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. *Animal Feed Sci. Technol.* 2007;(134):283-294.

80. Yu R.J., Harmon S.R., Blank F. Hair digestion by a keratinase of Trichophyton mentagrophytes. *J. Invest. Dermatol.* 1969;(53):166-171.

81. Yu S., Thøgersen J.B., Kragh K.M. Comparative study of protease hydrolysis reaction demonstrating Normalized Peptide Bond Cleavage Frequency and Protease Substrate Broadness Index. *PLOS ONE.* 2020. September. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239080>.

82. Zuo J., Ling B., Long L., Li T., Lahaye L., Yang C., Feng D. Effect of dietary supplementation with protease on the growth performance, nutrient utilization, intestinal morphology, digestive enzymes and gene expression of weaned piglets. *Anim. Nutr.* 2015;(1):276-282.

ОБ АВТОРАХ:

Валерий Сергеевич Крюков, доктор биологических наук, профессор, kryukov.v.s@mail.ru

Сергей Владимирович Зиновьев, кандидат с.-х. наук, neollit_13@mail.ru

Роман Владимирович Некрасов, доктор с.-х. наук, профессор, nek_roman@mail.ru

ABOUT THE AUTHORS:

Valery S. Kryukov, Doctor of Biological Sciences, Professor, kryukov.v.s@mail.ru

Sergey V. Zinoviev, Candidate of Agricultural Sciences, neollit_13@mail.ru

Roman V. Nekrasov, Doctor of Agricultural Sciences Sci., professor, nek_roman@mail.ru

НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ •

Коронавирус SARS-CoV-2 может быть опасен для свиней

По мнению канадских ученых из Манитобского университета, свиньи могут заразиться коронавирусом SARS-CoV-2. В более ранних исследованиях, показавших, что SARS-CoV-2 не опасен для свиней, не измерялась сероконверсия – выработка или повышение титров антител в ответ на инфекцию в организме, пояснили ученые. Они отобрали 19 восьминедельных свиней и ввели им через нос раствор с SARS-CoV-2 в концентрации в 10 раз выше, чем в предыдущих исследованиях. В течение следующих двух недель у животных каждый день брали пробы крови, а с 3-го по 29-й день после заражения их усыпляли и изучали ткани. Начиная с первого дня, у всех свиней появлялись выделения из глаз в умеренном количестве, а у некоторых – выделения из носа, температура при этом оставалась нормальной. Респираторных симптомов, за исключением легкого кашля у одной из свиней, не наблюдалось.

У трети свиней была выявлена реакция иммунной системы на вирус. У одной из них (у которой появился кашель) после умерщвления в лимфоузлах были обнаружены живые вирусные частицы. Еще у двух РНК вируса выявлялась в смывах из носа. На 10-й день эксперимента, – для выяснения, возможна ли передача вируса, – к зараженным свиньям подсадили двух здоровых. Здоровые животные не заразились. Тем не менее, заключили исследователи, это не означает, что заражение невозможно в принципе.

Новые ветеринарные правила по борьбе с классической чумой свиней вступают в силу в марте 2021 года

Новые ветеринарные правила по борьбе с классической чумой свиней, утвержденные приказом Минсельхоза России № 580, вступят в силу с марта 2021 года.

Новые ветправила, пояснили в Минсельхозе, включают актуальные и современные меры по профилактике, диагностике и ликвидации очагов классической чумы свиней (КЧС). Так, для профилактики заболевания специалистов госветслужбы обязывают проводить вакцинацию восприимчивого поголовья по плану на текущий год. А владельцев свиней – сообщать в госветслужбу о любых изменениях в их поведении, заболеваемости и падеже в течение 24 часов. В ветправилах учитывается принцип регионализации (владельцы свиней обязаны соблюдать условия, запреты, ограничения в связи со статусом региона по КЧС). Решение по регионализации принимает Россельхознадзор.

Документ указывает мероприятия, которые необходимо проводить при подозрении на классическую чуму свиней, порядок диагностики. Например, если КЧС подозревают в хозяйстве, где содержится от 16 до 50 голов, пробы для анализа нужно отобрать у 15 животных. Если в хозяйстве вводится карантин, он будет действовать минимум 30 дней. В эпизоотическом очаге запрещается лечение больных свиней, их отправляют на убой. Во время вспышки КЧС не разрешается перегруппировывать и перемещать свиней даже внутри хозяйства. Запрещено вывозить из неблагополучного пункта животных, корма, инвентарь и продукты убоя. А после снятия карантина из неблагополучного пункта еще 90 дней не разрешается вывозить свиней и продукты убоя, не прошедшие термическую обработку.