

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

НУТРИЄНТНИЙ СТАТУС *CARASSIUS GIBELIO* ЗА УМОВ
ЗАСТОСУВАННЯ КОРМОВОЇ ДОБАВКИ НА ОСНОВІ
«ПРОТОСУБТИЛІН А-120»

Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконав: Онофрей Олександр Романович
студент 4 курсу, групи 407
спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Керівник:
Кандидат біологічних наук
доцент Худа Л.В.

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № __ від _____ 2025 р.
Зав. кафедри проф. Волощук О.М.

Чернівці – 2025

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена оцінці нутрієнтного статусу та показників росту *Carassius gibelio* при вигодовуванні з використанням кормових добавок на основі базальтового туфу, ферментного препарату «Протосубтилін А-120» та їх поєднань. Встановлено, що середньодобовий відносний приріст маси *Carassius gibelio* за період експерименту є найбільшим в групах вигодовування яких здійснювали кормом з додаванням протосубтиліну. Застосування протосубтиліну в іммобілізованій на базальтовому туфі формі викликає підвищення даного показника до 0,75%, у вільній формі – 0,61%. Коефіцієнт конверсії корму для риб, що вигодовувались з додаванням іммобілізованого протосубтиліну є найменшим серед досліджуваних груп та сягає значення 3,32. Вміст білка в м'язах риб, що отримували корм з додаванням вільного протосубтиліну більший за контрольні значення на 14у добу експерименту, іммобілізованого – на 21у добу. Вміст ліпідів у вказаних групах риб не відрізнявся від контролю.

Ключові слова: протосубтилін, базальтовий туф, іммобілізація, середньодобовий приріст, кормовий коефіцієнт

ABSTRACT

The bachelor thesis is devoted to the assessment of the nutrient status and growth indicators of *Carassius gibelio* when fed with feed additives based on basalt tuff, the enzyme preparation “Protosubtilin A-120” and their combinations. It was found that the average daily relative weight gain of *Carassius gibelio* during the experiment was highest in the groups fed with feed supplemented with protosubtilin. The use of protosubtilin immobilized on basalt tuff increases this indicator to 0.75%, while in free form it is 0.61%. The feed conversion ratio for fish fed with immobilized protosubtilin is the lowest among the studied groups and reaches a

value of 3.32. The protein content in the muscles of fish fed with the addition of free protosubtilin is higher than the control values on the 14th day of the experiment, and immobilized protosubtilin on the 21st day. The lipid content in these groups of fish did not differ from the control.

Keywords: protosubtilin, basalt tuff, immobilization, average daily gain, feed conversion ratio

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Онофрей О.Р

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ I: ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1 Ферментні препарати та їх застосування в аквакультурі.....	8
1.2 Імобілізація ферментних препаратів та їх застосування.....	11
1.3 Характеристика базальтових туфів.....	14
1.4 Фізіолого-біохімічні особливості травлення прісноводних риб на прикладі <i>Carassius gibelio</i>	17
РОЗДІЛ II: МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	21
2.1 Матеріали досліджень.....	21
2.2 Методи досліджень.....	21
2.2.1 Приготування дослідних кормів.....	21
2.2.2 Отримання дослідного матеріалу риб.....	22
2.2.3 Годівля експериментальних тварин та моніторинг показників росту.....	22
2.2.4 Визначення вмісту білка за методом Лоурі.....	23
2.2.5 Екстракція ліпідів за методом Фолча.....	24
2.2.6. Визначення вмісту загальних ліпідів фосфорнованіліновим методом.....	25
РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	26
3.1 Оцінка показників приросту маси риб за умов 21-добового вигодовування кормом з додаванням різних кормових добавок.....	26
3.2 Визначення кормового коефіцієнта.....	29
3.3 Оцінка вмісту білків в м'язах <i>Carassius gibelio</i> за умов вигодовування дослідними кормами.....	31
3.4 Визначення вмісту загальних ліпідів в м'язах риб.....	33
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	37
ДОДАТКИ	41

ВСТУП

Через стрімкий розвиток інтенсивної аквакультури в Україні стає актуальним питання збільшення продуктивності та мінімізації витрат на рибних підприємствах. Від того, чим живиться риба, залежить приріст маси та швидкий ріст товарної продукції, що на пряму впливає на прибуток.

Сучасні комбікорми містять всі необхідні поживні речовини. Білок є основним компонентом корму для вирощування риб. Найпопулярнішим джерелом білка, яке використовується наразі в промисловій аквакультурі це — рибне борошно. Даний кормовий продукт отримують з риби та рибних відходів. Рибне борошно містить не лише білки та незамінні амінокислоти, а також жирні кислоти, вітаміни (A, D, B12) та мінерали.

Інтенсивна аквакультура вимагає розробки економічної та ефективної кормової бази для риб. Оскільки рибне борошно є обмеженим ресурсом та з кожним роком дорожчає, з'явилась нагальна потреба шукати альтернативні джерела білка, жирів та інших нутрієнтів. Для того, щоб здешевити вартість, використовується рослинна або тваринна сировина, отримана з побічних продуктів харчової промисловості.

Часто в комерційних кормах за основу використовують альтернативну сировину не морського походження, яка має високу поживну цінність, але не володіє високою біологічною доступністю.

Перспективним напрямком досліджень є застосування кормових добавок, що покращують біодоступність кормової сировини, серед яких — гідролітичні ферментні препарати.

Процес іммобілізації дозволяє розробити більш стійкі та ефективні ферментні препарати, які в подальшому можна повторно використовувати.

Ензими можуть бути іммобілізовані на різноманітних носіях, з різними властивостями, основними з яких є:

- Біосумісність — матриця не має впливати на конформацію ензиму та не викликати його денатурацію;
- Хімічна та механічна стабільність — носій має бути стійким до температурних режимів, рН середовища тощо;
- Висока площа поверхні — покращує ефективність зв'язування;
- Здатність до повторного використання;
- Хімічна інертність — матеріал не має вступати в реакції зі субстратом або ферментом;
- Безпечність — якщо ферментний препарат призначений для живих організмів, матриця має бути не токсичною та не викликати проблем зі здоров'ям;
- Ціна — у більшій мірі процес іммобілізації використовують, щоб здешевити виробництво, відповідно перевага надається матеріалам, які більш доступні та дешеві.

Базальтовий туф – недорогий алюмосилікат, який можна використовувати в кормовиробництві як самостійну добавку – джерело мікроелементів, а також як носій для іммобілізації ферментного препарату. Висока площа поверхні, пористість, іонообмінна здатність, хімічна та термічна стабільність, інертність, низька вартість, робить даний алюмосилікат перспективним матеріалом для застосування його якості матриці для іммобілізації.

«Протосубтилін А-120 ГЗХ» - це комплексний ферментний препарат, який виробляється культурою *Bacillus subtilis*. Даний ферментний препарат каталізує гідроліз білків наявних в комбікормі, що сприяє кращому травленню та засвоєнню.

Враховуючи вищесказане, **мета дослідження** — оцінити нутрієнтний статус та показники росту *Carassius gibelio* при вигодовуванні з використанням кормових добавок на основі базальтового туфу, ферментного препарату «Протосубтилін А-120» та їх поєднань.

Були поставлені наступні **завдання**:

1) Виготовити експериментальні корми із додаванням базальтового туфу, а також вільного та іммобілізованого ферментного препарату «Протосубтилін А-120» ;

2) Оцінити ефективність застосування кормів із зазначеними добавками при 21-денному вигодовуванні *Carassius gibelio* за показниками приросту маси.

3) Визначити коефіцієнти конверсії експериментальних кормів.

4) Визначити динаміку вмісту загальних білків та ліпідів в м'язах *Carassius gibelio* при 21-денному вигодовуванні експериментальними кормами.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Ферментні препарати та їх застосування в аквакультури

Одним із ключових завдань сучасної рибницької біотехнології є підвищення ефективності годівлі, поліпшення засвоєння поживних речовин та зниження навантаження на довкілля. Одним з інноваційних підходів є застосування ферментних препаратів у складі кормів для гідробіонтів. Ці біокаталізатори мають здатність підвищувати перетравність кормів, покращувати фізіологічний стан риби, оптимізувати склад мікробіоти кишечника, а також мінімізувати викиди неперетравлених залишків у навколишнє середовище.

Ферментні препарати - це біологічно активні речовини, які містять очищенні ферменти або комплекс ферментів.

Ферментні препарати, додані до корму, працюють переважно у просвіті шлунково-кишкового тракту риб, доповнюючи або підсилюючи дію ендогенних ферментів. Основна мета — покращити розщеплення макромолекул (білків, жирів, вуглеводів, фітинів, клітковини) до форм, доступних для всмоктування. Ферментні препарати для гідробіонтів здебільшого отримують із мікробного джерела (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma spp.*) або екстрагують із шлунково-кишкового вмісту ссавців

Ці речовини мають широке коло застосування в біотехнології:

1. Червона біотехнологія — ферментна терапія, використання травних ферментів, використання ферментів для лікування метаболічних захворювань [15];
2. Зелена біотехнологія — обробка насіння, руйнування пектинових оболонок;
3. Жовта біотехнологія — розробка кормових добавок;

4. Блакитна біотехнологія — застосування ферментів для покращення показників росту та здоров'я аквабіонтів.
5. Біла біотехнологія — біокаталіз, біоенергетика, виготовлення спирту, цукру, органічних кислот;
6. Сіра біотехнологія — каталіз забруднюючих речовин, біоремедіація;
7. Золота біотехнологія — біоінформатика, робота з ферментами.

В сільському та рибному господарстві переважно використовують ферменти класу гідролаз, зокрема:

1. Протеїнази — каталізують розщеплення пептидних зв'язків у білках, утворюючи пептиди або амінокислоти;
2. Амілази — каталізують розщеплення α -1-4 глікозидних зв'язків у полісахаридах, утворюючи мальтозу, декстрини та глюкозу;
3. Целюлази — каталізують розщеплення β -1-4 глікозидних зв'язків у целюлозі, утворюючи глюкозу
4. Фітази — розщеплюють фітинову кислоту, що збільшує біодоступність фосфору, знижує вміст фітатів, які є антипоживними речовинами.

Слід зазначити, що використання комплексних ферментних препаратів є більш ефективним, ніж застосування ензимів одного типу [17].

Вибір препарату базується на декількох факторах:

1. Тип ферменту;
2. активність;
3. можливості інкапсуляції;
4. термостабільність;
5. стійкість до рН;
6. безпечність;
7. ціна.

У молодих риб або у видів з обмеженою ферментативною активністю (наприклад, при згодовуванні кормів рослинного походження) ферментні добавки дозволяють частково компенсувати недостатню продукцію трипсину, амілази, ліпази, протеази тощо.

Ферментні препарати на основі фітаз підвищують біологічну доступність фосфору та інших мінералів, в результаті розщеплення рослинних фітатів.

Ферментні препарати можуть бути важливим компонентом корму, які дають змогу компенсувати нестачу ендогенних біокаталізаторів для альтернативної сировини в кормі [17]. Так, показано, що додавання комплексних ферментних препаратів при вигодуванні великої рогатої худоби сприяє приросту маси на 9,9-10,2%. Також препарат позитивно вплинув на білкові показники крові [2].

При додаванні екзогенних протеаз в раціон риб *Oreochromis niloticus* спостерігалось збільшення приросту маси риб [17].

Встановлено, що екзогенні ферменти: ксиланази, амілази, протеази, фітази, підвищують перетравлення корму, а також нейтралізують антипоживні фактори зерна [9].

Окрім того, ферментні препарати є хорошою альтернативою використання антибіотиків, як стимуляторів росту, вони підвищують утилізацію корму, зміцнюють здоров'я тварин, без ризику антибіотикорезистентності [9].

Використання екзогенних ферментів неодноразово показує високу продуктивність, але кормові добавки можуть покращувати травлення лише до певної межі, яка не перевищує фізіологічні бар'єри, такі як рН і час перебування в шлунково-кишковому тракті, де вони втрачають свою ефективність. Також слід врахувати економічну складову, транспортування, доцільність використання [20].

Ферментні препарати відіграють фундаментальну роль у сучасній біотехнології аквакультури. Їхнє застосування дозволяє ефективно вирішувати проблеми недостатньої перетравності рослинних кормів, покращувати фізіологічний стан риб, зменшувати витрати кормів і знижувати екологічне навантаження на водойми. Особливу увагу слід приділяти адаптації складу ферментного препарату до конкретного виду риби та умов її утримання. У майбутньому можна очікувати впровадження більш складних біоактивних композицій, зокрема ферментно-пробіотичних комплексів, генетично оптимізованих ензимів та технологій інкапсуляції.

1.2 Імобілізація ферментних препаратів та їх застосування

Інженерна ензимологія — розділ біотехнології, мета якого, розробка та модифікація ферментів для використання в різних галузях промисловості, починаючи з харчової, сільськогосподарської, медичної, закінчуючи косметичною, екологічною, тощо.

Одним із основних методів інженерної ензимології є імобілізація, яка являє собою процес закріплення ферментів на поверхні або всередині твердих носіїв — матриць, за допомогою хімічних або фізичних зв'язків, що дає можливість багаторазового використання та полегшеного вилучення препарату зі субстрату. Ферменти в імобілізованій формі мають кращу стабільність, твердий носій підтримує структуру ферменту, робить їх міцнішими, що підвищує каталітичну активність ензиму [19; 26].

Для імобілізації ферментів в ролі матриць використовуються різні носії та методи. Найлегшим методом є адсорбція — це приєднання ферменту на поверхню пористого носія, найчастіше це: активоване вугілля, цеоліт, силікагель, акрилові смоли і т.д. Основними перевагами цього методу є дешевизна і доступність, проте такі препарати мають меншу стабільність.

Ковалентний метод приєднання передбачає формування міцних ковалентних зв'язків між носієм та ензимом, реакція відбувається між білком та функціональною групою матриці, утворюючи ефірний зв'язок. Цей метод зменшує втрати ензиму, але може вплинути на структуру самого білка.

Вбудовування — це метод інкапсулювання ферменту всередину полімерних гелів (альгінат, агароза) чи капсул (ліпосом, мікрокапсул). Таким чином, фермент зафіксований у матриці, яка пропускає субстрат і продукт.

Вибір методу імобілізації та носія залежить від багатьох факторів, від специфіки ферменту, від умов використання, температури, рН, доступності, стабільності. Особливої уваги заслуговує використання природних мінералів як матриць для імобілізації, зокрема цеолітовмісних порід, таких як

базальтові туфи. Завдяки пористій структурі, хімічній інертності, високій площі поверхні та наявності функціональних груп, ці матеріали створюють ідеальні умови для фіксації ферментів без значної втрати активності. Мікропориста структура сприяє рівномірному розподілу білкових молекул, а іонний склад мінералів дозволяє налаштовувати сорбційні властивості носія під конкретний тип ферменту.

Функціональні переваги іммобілізованих ферментів реалізуються в широкому спектрі біотехнологічних галузей. У харчовій промисловості іммобілізовані протеази, амілази, лактази та інвертази використовуються для гідролізу білків, вуглеводів і жирів у контрольованих умовах, що дозволяє отримувати високоякісні продукти із заданим профілем смакових і структурних властивостей. У процесах виробництва безлактозного молока, глюкозо-фруктозного сиропу, низькалактозних дитячих сумішей саме іммобілізовані ферменти стали технологічною основою сучасних ліній. Завдяки стабільності в широкому діапазоні температур та рН, а також можливості багаторазового використання, вони значно перевищують ефективність вільних форм.

Іммобілізація лужної протеази на мезопористому цеоліті, для перетворення молока на сир, показала 74% ефективності після 16 днів зберігання, вільні протеази зберегли лише 50% [19].

У фармацевтичній біотехнології іммобілізовані ферменти застосовуються для синтезу амінокислот, нуклеозидів, антибіотиків та в процесах біотрансформації лікарських речовин. Наприклад, іммобілізовані трансамінази дозволяють проводити стереоспецифічні реакції з високим виходом цільових продуктів.

У галузі екобіотехнологій іммобілізовані ферменти виступають як каталітичні агенти для деструкції забруднювачів, включаючи нафтопродукти, феноли, пестициди, ксенобіотики. Іммобілізовані пероксидази, лаккази, гідролази використовуються в біореакторах для очищення стічних вод, ґрунтів та газових викидів. Встановлено, що системи на основі туфів та цеолітів

демонструють високу ефективність при одночасному видаленні органіки та важких металів, оскільки поєднують каталітичні та сорбційні механізми. Фіксація ферментів на таких носіях сприяє їх захисту від деструктивної дії агресивного середовища, стабілізації просторової структури та подовженню терміну активного функціонування.

Дослідження показали, що використання методів інженерної ензимології в інтенсивній аквакультури може позитивно впливати на імунітет вирощуваної риби, поліпшення здоров'я кишечника, пригнічувати ріст шкідливих бактерій [17]. Було показано, що фітаза, іммобілізована на наночастинках, краще витримує підвищенні температури та кисле середовище, ніж вільна фітаза [5].

Іншим перспективним напрямом є застосування іммобілізованих ферментів у діагностичних системах та біосенсорах. Такі ферменти, зафіксовані на мінеральних або полімерних носіях, використовуються для визначення глюкози, лактату, холестеролу, алкоголю та інших біохімічних показників у медичній та ветеринарній практиці. Завдяки стабільності іммобілізованих систем, можлива тривала експлуатація діагностичних елементів без втрати чутливості. Мінеральні носії, зокрема активовані туфи, дозволяють створювати біосенсори з розширеним діапазоном роботи, кращим контролем мікрооточення ферменту та високою відтворюваністю результатів.

У підсумку іммобілізація ферментів є важливим біотехнологічним інструментом, що дозволяє збільшити ефективність, стабільність біокаталітичних процесів.

1.3 Характеристика базальтових туфів

Базальтові туфи — це мінерали вулканогенного походження, належать до класу пірокластичних гірських порід, які утворились в наслідок вулканічної діяльності. Утворення таких туфів відбуваються через виверження вулканів, під час яких базальтовий магматичний матеріал розпадається на фрагменти різного розміру, даний матеріал осідає у вигляді зцементованих мас, які після діагенезу набувають характерні властивості туфів.

За хімічним складом, пористістю та структурними властивостями близькі до цеолітів. Мінералогічний склад має мінерали темнокольорового ряду, зокрема піроксени, олівін, плагіоклази. Матриця даної породи утворена дрібнодисперсною вулканокластичною масою. Структурно базальтові туфи мають пористу текстуру та високу гетерогенність.

Геохімічна характеристика цих порід відзначається високим вмістом SiO_2 – 45-52%, $\text{FeO}+\text{Fe}_2\text{O}_3$, MgO , CaO . Через низький вміст лужних оксидів, базальтовий туф має середній рівень кислотності, ці властивості мають важливе значення при використанні в якості фільтруючих матеріалів, у гідрогеології чи агрономії, де поглинання й десорбція катіонів, таких як амоній, калій, кальцій, може сприяти рівновазі водно-мінерального компонування середовища.

Фізико-механічні властивості базальтових туфів різко залежать від їхнього ступеня зцементованості. У малозцементованих формах міцність на стиск сягає 2–10 МПа, що послаблюється під впливом вологи та механічного навантаження. Разом з тим такі різновиди мають низьку теплопровідність, чудову оброблюваність і високу здатність до фільтрації.

Промислове значення базальтових туфів обумовлено їх характером: вони ефективно використовуються як легкі заповнювачі для виробництва теплоізоляційних та звукопоглинаючих матеріалів, природні фільтри для очищення стічних вод, сорбенти важких металів і нафтопродуктів, а також іонообмінні матеріали у сільському господарстві. Через підвищену пористість і високу внутрішню площу матеріалу туф вбирає і зберігає вологу, поступово віддаючи її рослинам, що дозволяє використовувати його в ґрунтових сумішах

для збереження родючості та водного балансу. Особливу роль відіграють цеолітові фази, що виникають у процесі вторинної трансформації — вони підвищують іонообмінні характеристики до 1–2 моль/кг, що значно більше, ніж у нецеолітових матеріалів.

Стійкість базальтових туфів до токсичних середовищ визначається низькою мобільністю важких металів у їхньому складі. Посилена сорбційна здатність дозволяє фіксувати кадмій, свинець, цинк і мідь, що з одного боку обмежує екологічне навантаження на ґрунтові та водні системи, а з іншого робить матеріал потенційно ефективним для ремедіації забруднених зон. Водночас інтенсивне виділення іонів може спостерігатися лише за умов сильних кислотних впливів або при наявності агресивних агентів, що практично не характерно для природних середовищ. Тому туфи можуть використовуватися як геохімічні бар'єри або матеріали для відновлення деградованих екосистем.

За хімічною природою є алюмосилікатами, володіють високою об'ємною ємністю та хімічною інертністю, мають здатність до йонного обміну, кристалічною формою з однорідними порами, що робить їх перспективним матеріалом для біотехнологічних застосувань, зокрема, як матриця для іммобілізації ферментних препаратів, фільтрування, адсорбція.

Базальтові туфи використовують у сільському господарстві. Встановлено, що додавання цеолітовмісних базальтових туфів до раціону худоби може бути одним із засобів покращення повноцінності продукції тваринництва. В роботі Кобаса І.М. зі співавт. було показано, що використання базальтових туфів в підгодівлі дійним коровам та дорослим свиням підвищує продуктивність тварин на 11 - 16 % та знижує собівартість виробництва продукції на 8 - 14 % [1]. Дослідження показали, що додавання туфу, як мінеральну добавку до раціону молодняку свиней, сприяє підвищенню еритроцитів в крові, кращому травленню, та приросту маси.

Цеоліти також використовувались у птахівництві, що дозволяло покращити продуктивність птиці та підвищити економічні показники [1].

Білоцерківський національний аграрний університет сконструював стабілізовані ферментні препарати з фітазною активністю шляхом іммобілізації на сапоніті та базальтовому туфі. Вони отримали максимально активні кормові добавки з фітазною активністю та досягли мінімальних втрат біокатализатора.

Крім цього, базальтові туфи використовуються у виробництві біореакторів для очищення вод у рибницьких господарствах та аквапоніці. Їх застосування у фільтраційних системах дозволяє стабілізувати мікробіологічний баланс, зменшуючи токсичність азотних сполук, поглинаючи фосфати та органіку, а також виступаючи фізичним бар'єром для завислих часток. Біофільтраційна ефективність туфів доведена при культивуванні як прісноводних, так і морських гідробіонтів, особливо у системах замкненого водопостачання (RAS). Пориста структура туфу сприяє активному газообміну, водообігу та стабільності біоплівкових процесів, при цьому матеріал не вивільняє токсичних компонентів і не створює додаткового хімічного навантаження на систему.

У промисловій ферментації туфи можуть виконувати функцію інертного носія для іммобілізованих клітин чи ферментів. Завдяки стабільності в широкому діапазоні рН і температур, мінерал не піддається деградації в агресивному ферментаційному середовищі, а також зберігає активність іммобілізованих ферментативних систем упродовж тривалого часу. Дослідження показують, що туфи, активовані механічно або термічно, здатні утримувати клітини дріжджів, ацетобактерій, лактобактерій без значної втрати активності, що робить їх перспективними у виробництві біоетанолу, органічних кислот, ферментів або у процесах біодеструкції ксенобіотиків.

Така різноманітність застосування туфів відкриває широке поле для досліджень. Ми припускаємо, що використання цих мінералів в рибному господарстві може збільшити приріст маси та позитивно вплинути на клінічні показники крові риб.

Ми використовували базальтовий туф не тільки як джерело мінералів, а і як матрицю для іммобілізації ферментного препарату «Протосубтилін А-120».

Протосубтилін - це комплекс протеолітичних ферментів, отриманих з *B.subtilis*, що гідролізує розщеплення білків до амінокислот. В промисловості використовується для гідролізу рослинних білків, які знаходяться у зерні до біодоступних пептидів та амінокислот для кращого засвоєння тваринами та мікроорганізмами.

Оптимальні умови використання: · рН – 6,0 – 7,0; · температурний режим 45-55 °С. Даний комплекс складається з таких ферментів:

- Нейтральна протеза 120 од/г;
- Лужна протеаза до 11000 од/г;
- β -глюканаза до 200 од/г;
- Ксиланаза до 150 од/г;
- β -амілаза до 300 од/г;

1.4 Фізіолого-біохімічні особливості травлення прісноводних риб на прикладі *Carassius gibelio*

Сріблястий карась - представник прісноводної родини корошових *Cyprinidae*. Розповсюджений в Європі та Азії, є аборигенним видом від центральної Європи до Сибіру. Живиться планктоном, природними безхребетними.

Травна система має типову для корошових будову, яка адаптована до всеїдності. Головні етапи травлення включають: механічну, хімічну та ферментативну обробку корму, яка здійснюється у ротовій порожнині, глотці, кишечнику за участі залоз - печінки та підшлункової.

Морфологічно система травлення *C.gibelio* має просту, але ефективну будову. Як і більшість представників корошових, у нього відсутній шлунок. Ротова порожнина містить глоткові зуби, які забезпечують механічне

подрібнення корму. Розвинена ферментна система підшлункової залози та печінки частково компенсують відсутність шлунку.

Травна трубка складається з ротового отвору, стравоходу та переднього, середнього та заднього відділів кишечника. Процес травлення починається у ротовій порожнині, де відбувається механічне подрібнення корму, після чого їжа рухається по довгому кишечнику. На кишечнику розташовані слизові ворсинки, які збільшують площу поверхні всмоктування. В кишечнику активуються ферменти, які гідролізують полімерні сполуки до мономерних. Амінокислоти, жирні кислоти та глюкоза всмоктується ентероцитами, після чого надходять до печінки.

Печінка карасів утворює жовч, яка надалі емульгує жири, виконує метаболічні функції, зокрема детоксикацію та перетворення продуктів травлення. Підшлункова залоза секретує травні ферменти: амілази, протеази, ліпази. Також відсутність шлунку компенсується довжиною та формою тонкого кишечника, яка забезпечує ефективне перетравлювання їжі [13].

Через велику варіативність їжі, яку можуть споживати коропові, вони мають розвинену ферментну систему. Основні протеолітичні ферменти які беруть участь у травленні - це трипсиноподібні та хімотрипсиноподібні протеази. Гідроліз білків відбувається у лужному середовищі кишечника, оптимум якого 8-9 рН. Пепсиноподібна кисла протеаза відсутня. При кислотності менше 6 рН, травні ферменти коропових денатуруються [13].

Також сріблястий карась має α -амілазу, оптимум якої 7-9 рН, та ліпазу (рН 8-9). Ліпази *Carassius gibelio* активуються залежно від вмісту ліпідів в раціоні риб. Підвищення активності ліполітичних ферментів спостерігаються при споживанні корму, який багатий на ліпіди та при підвищенні температури води. Регуляція відбувається на транскрипційному рівні, де відповідні гени ферментів активуються чи пригнічуються відповідно до умов середовища.

Ферментативна активність коропових залежить від дієти. Під час годування *Rutilus rutilus* їжею з великим вмістом рослинного білка, піддослідні

риби продукували більші кількості протеаз, ніж риби, які споживали тваринний білок [11].

Умови навколишнього середовища такі як: температура води, рівень кисню, рН води також впливають на ферментативні системи карпових.

Завдяки такій гнучкості, *C. gibelio* добре пристосовується до змін кормової бази, коливань температури та рівня розчиненого кисню.

При низькій концентрації кисню у воді, сріблястий карась демонструє здатність до перебудови енергетичного обміну, а саме активації анаеробного гліколізу. Це супроводжується підвищенням активності лактатдегідрогенази, що продукувати енергію в умовах обмеженого доступу кисню.

В порівнянні з іншими видами родини *Cyprinidae*, даний представник має вищу активність амілази за рахунок споживання рослинного білка, але нижчу в порівнянні з *Cyprinus carpio* ліпазну активність.

Забрудненість водою також впливає на ферментативні системи карася сріблястого. За дії важких металів або пестицидів відбувається інгібування амілази, порушується секреція жовчі, пошкоджується слизова оболонка, що в результаті погіршує процеси травлення.

Отже, використання ферментних препаратів в інтенсивній аквакультури покращує біодоступність нутрієнтів та знижує розхід корму, що зменшує витрати на корми. Більше того, екзогенні ензими здатні розщеплювати сировину, яку риба не може перетравити та знизити кількість антинутрієнтів, що дозволяє використовувати альтернативні джерела білка.

Для покращення травлення можливе використання мультиензимних гідролітичних ферментних препаратів, наприклад препарату «Протосубтилін А-120», який є недорогим та ефективним джерелом протеаз. Використання цієї кормової добавки може знизити використання комбікорму.

Процеси іммобілізації дозволяють зробити ензимні препарати більш стабільними та дозволяють використовувати їх повторно. Базальтові туфи через свою пористу структуру, велику площу поверхні, інертність, є

перспективною добавкою не тільки як самостійне джерело мінералів, але й як матриця для іммобілізації.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали досліджень

Експериментальні дослідження проводили в рециркуляційній аквакультурній системі на базі навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів.

Дослідним об'єктом ми обрали *Crassius gibelio*, оскільки вони є витривалими до зміни екологічних умов, мають швидкі темпи росту, не вибагливі до харчування, нерестяться в широких діапазонах температур. Добре витримують низькі концентрації кисню та забруднення. Через свої якості часто використовується як перспективний експериментальний об'єкт в сучасній аквакультурі [8].

2.2 Методи досліджень

2.2.1 Приготування кормів

Для приготування дослідного корму, ми обрали гранульований комбікорм торгової марки «Aller Bronze».

Початковим етапом приготування було розмочування корму у воді та перетирання до гомогенної консистенції. Однорідну масу комерційного корму ми змішували з кормовою добавкою.

Для досліду ми сформували три дослідні групи та контрольну:

Група П — в корм додавали ферментний препарат «Протосубтилін А-120», 1г/кг корму;

Група Т - в корм додавали базальтовий туф з родовища «Полицьке-П», у кількості 4% від сухої маси корму.

Група Т+П — для приготування харчової добавки для цієї групи, була проведена іммобілізація ферментного препарату, в якості матриці використовувати базальтовий туф. Вміст туфу становив 4% від сухої маси корму, кількість туфу становила 1г/кг корму. Дану суміш іммобілізували, витримували в фосфатному буфері з рН 7.4 та витримували в термостаті з температурним режимом 30 °С протягом однієї години.

Для забезпечення однорідності та форми суміш пропускали через шприц з обрізаним носиком, для формування гранул. Гранули висушували при кімнатній температурі протягом 3-4 діб.

2.2.2 Годівля експериментальних тварин та моніторинг показників росту

Порція дослідного корму вираховувалась як 2.5% від загальної маси дослідної групи. Годування проводилось 21 день.

Заміри показників росту дослідних риб проводились на 1, 7, 14 та 21 день.

Розрахунок середньодобового приросту маси тварин проводили за формулою:

$$\frac{\frac{X_2 * 100}{X_1} - 100}{n} \%$$

де,

X_1 - початкові параметри дослідного об'єкту;

X_2 — кінцеві параметри;

n – день дослідження.

2.2.3 Отримання дослідного матеріалу риб

Для проведення дослідження, щоб отримати зразки м'язової тканини, утримували дослідних риб в ємностях з водою, в якій розчиняли «Пропісцин» для анестезуючого ефекту, в концентраціях 1мл/л. Процедура тривала 15 хвилин, після чого відбувалась препація. Дослідний матеріал зберігали в чашках Петрі в холодильнику з температурним режимом -6 °С.

2.2.4 Визначення вмісту білка за методом Лоурі

Це колориметричний метод, за допомогою якого визначається кількість білку в сировині. Метод був розроблений Олівером Х. Лоурі в 1951 році. Метод базується на здатності йонів Cu^{+2} у лужному середовищі формувати комплекс з пептидними зв'язками, утворюючи одновалентні молекули іони міді, входять в реакцію з реактивом Фоліна (фосфомолібденова кислота з фенолом), з утворенням нестабільного продукту, який переходить в молібденову синь, яка має максимум поглинання при 750 нм.

Для проведення експерименту ми попередньо приготували реактиви:
Реактив А: 1 г NaOH додавали 5 г Na_2CO_3 , суміш доводили дистильованою водою до 250 мл;

Реактив В: 0,5 г цитрату натрію додавали 0.25 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;

Реактив С: 50 мл реактиву А + 1 мл реактиву В

Реактив Е: розведений реактив Фоліна 1:1 водою.

Перед визначенням кількості білка ми проводили гомогенізацію наважки м'язів 0.38 г в 2 мл 0.1 М фосфатному буфері, рН 7.2;

Для дослідної проби відбиралось 0.1 мл гомогенату, до нього додавали 0.9 мл H_2O , потім 2 мл реактиву С;

Суміш перемішувалась та витримувалась протягом 10 хвилин;

Далі в дослідні проби ми додавали 0.2 мл реактиву Е та лишали їх в темному місці на 30 хв.

Проби колориметрувались при 750 нм в кюветах 0,5 мм.

За контроль брали 1 мл H_2O , за холосту пробу проводили калібрування зі стандартним розчином білка.

2.2.5. Екстракція ліпідів за методом Фолча

Ліпіди зі зразків м'язової тканини екстрагувалися за методом Фолча, суть якого базується на екстракції ліпідів сумішшю хлороформ метанол у співвідношенні 2:1.

Використання цієї суміші забезпечує ефективне руйнування полярних і неполярних структур клітини, відокремлюючи їх на відповідні фази.

У дослідний зразок м'язів, наважкою 0.05 г, ми додавали 1 мл суміші хлороформу та метанолу, проби перемішувались та центрифугувались 10 хв при 10 тисячах обертів. З центрифугату ми відбирали верхню фазу, додавали 2 частини фізіологічного розчину NaCl 0.9% для утворення фазового розподілу. З отриманих проб відібрали нижні хлороформні фази, які містили розчинені ліпіди для проведення подальшого експерименту.

2.2.6 Визначення загальних ліпідів фосфорнованіліновим методом

Визначення кількості ліпідів в наважці м'язів проводилось колориметричним методом з додаванням фосфорнованілінового реактиву.

Метод заснований на колориметричному визначенні ліпідів шляхом утворення забарвлених сполук. В процесі аналізу проб, зразок обробляється концентрованою сірчаною кислотою на водяній бані, в результаті ліпіди розщеплюються з утворенням карбокатионів, який при взаємодії з ваніліном та ортофосфорною кислотою дає кольоровий комплекс рожевого кольору, проби міряються при довжині хвилі 530-540 нм.

З отриманого гомогенату ми відбирали 0.02 мл екстракту, додавали 1,50 мл сірчаної кислоти, перемішували та витримували на киплячій водяній бані протягом 15 хвилин.

Після охолодження зразків, ми відбирали 0.20 мл гідролізату та додавали 3 мл фосфорнованілінового реактиву, проби витримували 50 хвилин при кімнатній температурі. Вимірювання проводилось на фотоелектроколориметрі за довжині хвилі 540 нм, проти контрольного розчину.

Розрахунок проводився за формулою:

$$C = \frac{D}{E_{\text{калібратор}}} * 8 - \text{мг/мл} \quad (2.1)$$

Де С — концентрація у дослідній пробі, мг/мл;

Е — екстинція калібрувальної проби, од. екстинкції.

Перерахунок на вміст ліпідів на грам тканини здійснювали за формулою

$$A = \frac{C * V_{\text{екстрагенту}}}{V_2 * m_{\text{наважки}}} - \text{мг/г тканини} \quad (2.2)$$

де А — вміст ліпідів на грам тканини;

С - концентрація в дослідній пробі;

V екстрагенту, об'єм хлороформ-метанол суміші;

m – маса наважки;

V₂ - об'єм проби, мл.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Оцінка показників приросту маси риб за умов 21-добового вигодовування кормом з додаванням різних кормових добавок

Оцінка застосованих кормових добавок в ході експерименту здійснювалась за показниками масонакопичення риб, зокрема аналізували динаміку середніх мас в кожній групі, а також відповідно до значення середньодобового приросту мас за кожен етап експерименту. Вигодовування тривало 21 день, у три етапи – I, II та III тиждень. Окрім того, були пораховані величини кормового коефіцієнту, а також оцінено нутрієнтний статус за показниками загального білку та загальних ліпідів м'язів.

Результати проведених досліджень показали поступове нарощення середньої маси особин в усіх досліджуваних групах протягом експерименту (рис. 3.1)

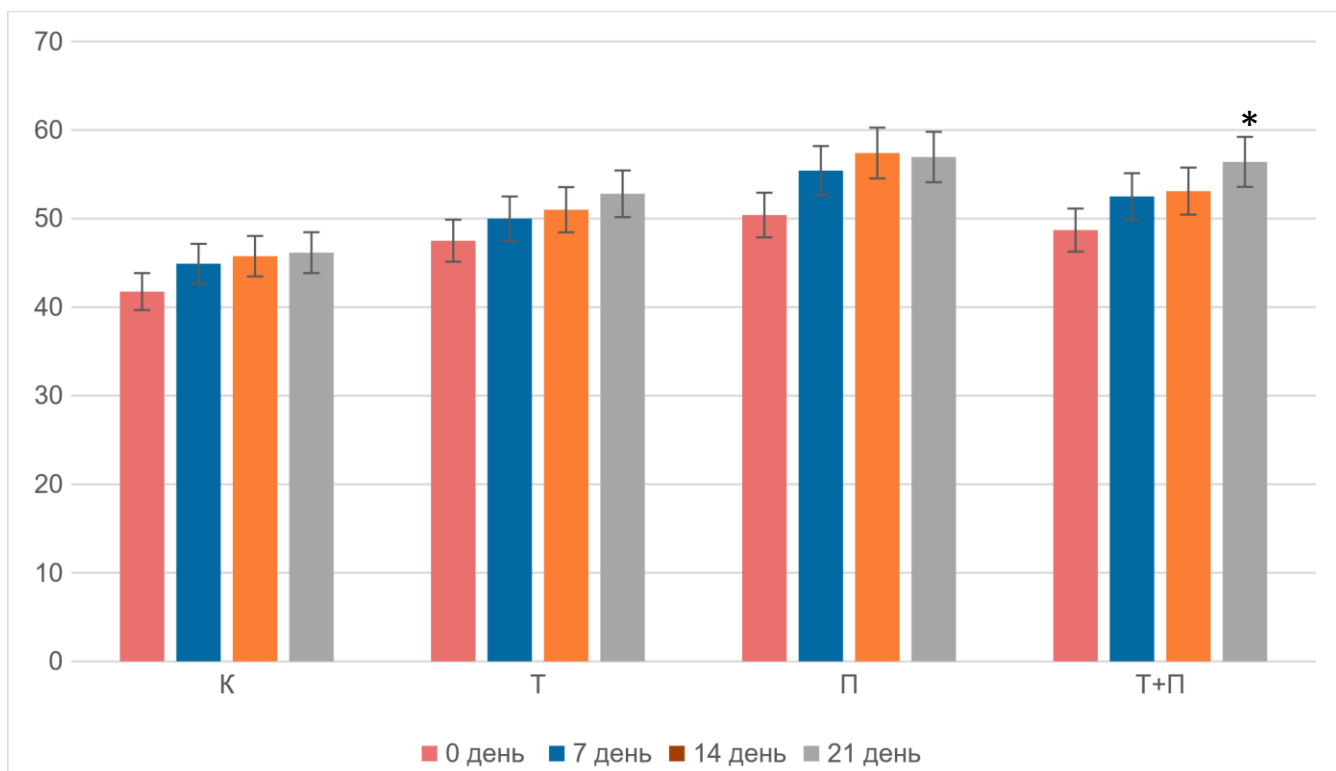


Рис. 3.1. Динаміка середніх мас (г) *Carassius gibelio* за умов 21-добового вигодовування кормом з додаванням різних кормових добавок

Примітка: * - достовірна різниця між контролем та групою Т+П ($p < 0.05$)

Слід зазначити, що для особин з контрольної групи та групи Т різниця між окремими тижнями не виражена, проте статистично достовірна при порівнянні мас між початковим та кінцевим етапом експерименту. Більш виражені зміни в динаміці ми спостерігали для групи риб, що вигодовувались із використанням вільної форми протосубтиліну – для них достовірна різниця з'являється вже через тиждень після початку годівлі. Аналогічну тенденцію, проте, виражену в меншій мірі, було зареєстровано і для групи, які отримували іммобілізований протосубтилін.

Тим не менше, отриманих значень не достатньо, щоб зробити кінцеві висновки щодо ефективності впливу використання кормових добавок на масонакопичення. З цією метою ми здійснили розрахунки середньодобового приросту маси.

Ми розраховували відносний середньодобовий приріст мас та отримали наступні данні (Табл 3.1).

Табл. 3.1.

Середньодобовий відносний приріст маси *Carassius gibelio* за умов вигодовування кормом з додаванням різних типів кормових добавок, %

Група тварин	0-7 доба	7-14 доба	14-21 доба	Весь період експерименту
К	1,08	0,27	0,12	0,50
Т	0,75	0,28	0,5	0,53
П	1,42	0,51	-0,11	0,61
Т+П	1,10	0,16	0,88	0,75

У групі риб, яким давали вільну форму ферментного препарату «Протосубтилін А-120» протягом перших двох тижнів спостерігався

найвищий темп росту приросту маси тіла серед усіх груп. Це свідчить про те, що протеази даного препарату збільшували біодоступність корму та позитивно впливало на його засвоєння.

Група яку вигодовували кормом з базальтовим туфом, показала помірні показники. Це може бути пов'язано зі природою даного алюмосилікату. Базальтовий туф володіє сорбційними властивостями, велика питома поверхня та пористість дозволяє адсорбувати токсини та інші сполуки.

Туф хімічно інертний та не має вступати в реакцію зі субстратом, проте існує ймовірність механічного зв'язування комбікорму та алюмосилікату, що знижує біодоступність харчового продукту.

Однією із переваг базальтового туфу це — великий вміст мікроелементів (Mg, Fe, Ca, Si), дані хімічні елементи можуть позитивно вплинути на метаболізм риби та травлення, але накопичення мікроелементів - це тривалий процес, що і демонструє посередня динаміка приросту маси даної групи.

Ефективність іммобілізованого протосубтиліна найкраще себе показала на третій тиждень. На 14 добу, ми спостерігали сповільнення набору середньої маси риб, це може бути пов'язано з стресовими факторами або низькою харчовою привабливістю алюмосилікату. Використання базальтового туфу як матриці для іммобілізації показало кращі показники ніж окреме застосування туфу.

Пори даного алюмосилікату зайняті ферментним препаратом, що запобігає будь якій взаємодії субстрату з матрицею.

Дана харчова добавка демонструє хорошу динаміку, не зважаючи на другий тиждень експерименту, показники були компенсовані за третього тижня.

Низькій приріст з періоду від 7 до 14 дня може бути обумовлений низьким апетитом риби. Хоч ми проводили експеримент в умовно закритій системі, нам приходилось втручатись, щоб проводити моніторинг мас риб, процес зважування риби може бути стресовим фактором для них, що й могло вплинути на апетит.

Отже, середньодобовий відносний приріст маси за весь період вигодовування виявився найбільшим в групах з додаванням до корму протосубтиліну, причому іммобілізована його форма дала кращі результати у порівнянні з вільною. Так, найбільший середньодобовий приріст маси спостерігався у групи, Т+П, за весь період експерименту середньодобовий приріст дорівнював 0.75%. На другому місці показала себе група П, середньодобовий приріст якої за весь період експерименту дорівнював 0.61%. Група, яку годували кормом з додаванням базальтового туфу мала приріст 0,53%, який не значуще відрізнявся від контрольного значення 0.5%

Таким чином, можна припустити, що додавання до корму протосубтиліну покращує засвоєння нутрієнтів, а іммобілізація на туфі покращує ефективність та стабільність даного ферментного препарату.

3.2. Визначення кормового коефіцієнта

Для того, щоб оцінити ефективність дослідного корму, ми визначали кормовий коефіцієнт за формулою:

$$KKK = \text{Загальна кількість корму} / \text{Загальний приріст ваги} \quad (3.3.1)$$

Оцінка кормового коефіцієнту має ключове значення для визначення ефективності кормів та кормових добавок. Даний показник виражає співвідношення між кількістю витраченої кормової сировини та приростом живої маси дослідних риб за певний період. Чим менші значення кормового коефіцієнту тим більше відбувається засвоєння корму.

Відповідно до загальноприйнятих нормативів, значення кормового коефіцієнту в діапазоні 2-3 притаманне інтенсивному типу вирощування коропових видів риб при вигодовуванні гранульованими комбікормами.

Однак, в разі застосування корму з вмістом білків близько 20-30%, а також при вирощуванні у відносно холодній воді (16%) значення коефіцієнту конверсії корму підвищуються до величини 4,7.

За результатами проведених досліджень встановлено, що значення кормового коефіцієнту відрізняються при застосуванні досліджуваних кормових добавок (рис. 3.2.).

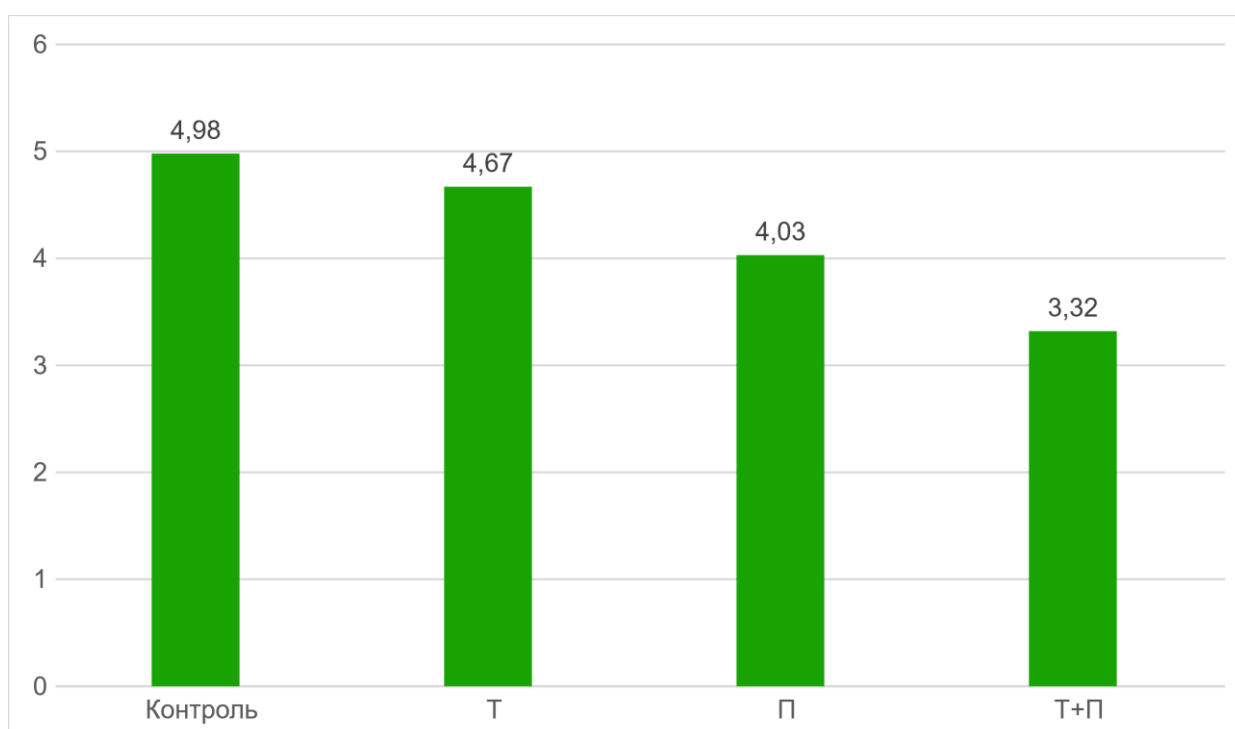


Рис. 3.2. Коефіцієнт конверсії корму з різними добавками

Аналіз результатів показав, що найефективнішим був корм з ферментним препаратом «Протосубтилін А-120», що цілком узгоджується з теоретичними даними. Так, найбільш ефективним коефіцієнт конверсії корму виявився в групі Т+П – його значення сягають 3,32 проти 4,98 у контрольній групі.

Отже, використання корму з додаванням протосубтитіліну має високий коефіцієнт конверсії, якій дорівнює 4,03 для вільної форми та 3,32 для іммобілізованої.

3.3. Оцінка вмісту білків в м'язах *Carassius gibelio* за умов вигодовування дослідними кормами

Вміст білка в м'язовій тканині є показником фізіологічного стану риб та їхнього метаболізму. Протягом експерименту ми провели три вимірювання на 7, 14, та 21 день, у кожній із груп.

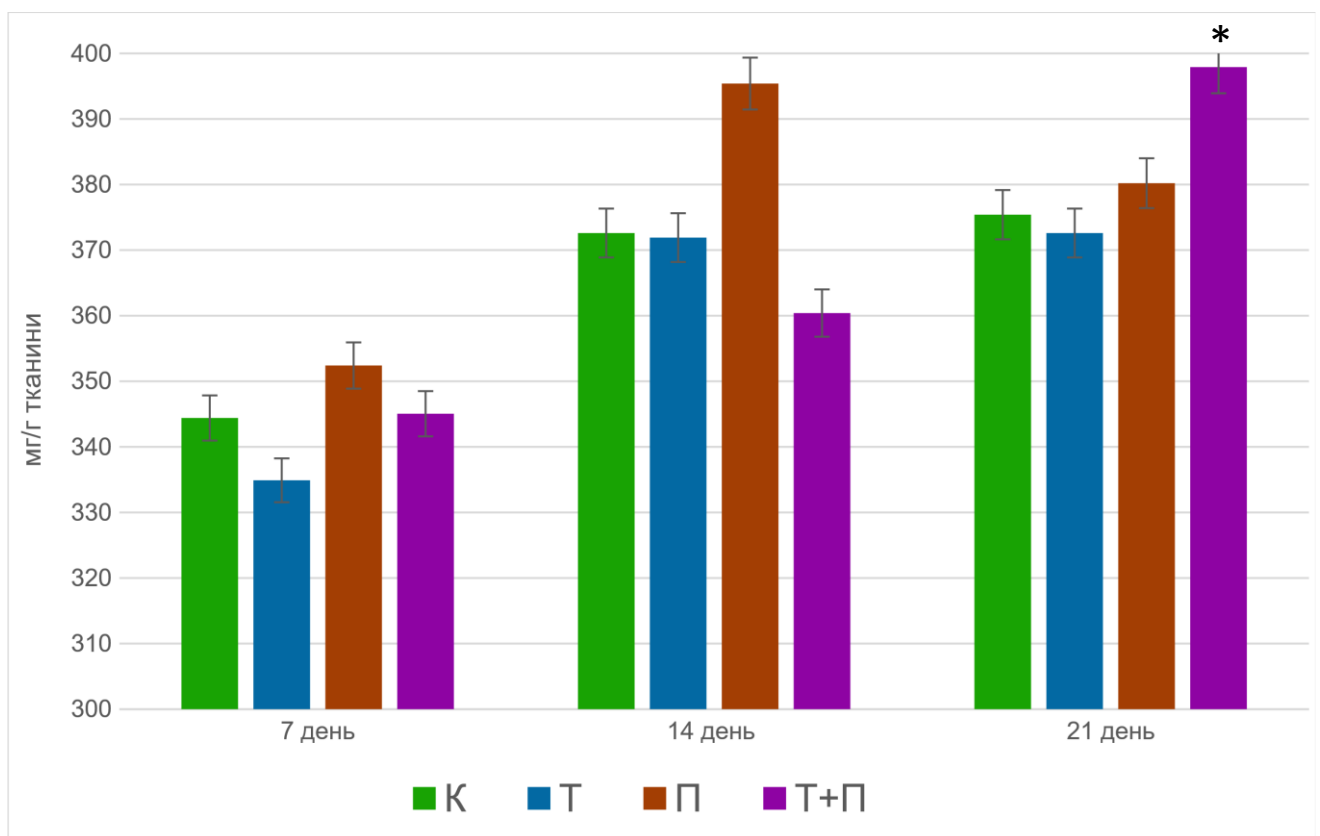


Рис 3.3. Кількість білків в м'язовій тканині *Carassius gibelio* за умов вигодовування дослідними кормами (мг/г тканини)

примітка: * - достовірна різниця між контролем та групою Т+П ($p < 0.05$)

З отриманих даних, зображених на рисунку 3.3 можна прослідкувати тенденцію до збільшення концентрації білка на тканину м'язів.

Аналіз вмісту білка по групах показав:

Група К — Контрольна група, яку вигодовували гранульованим кормом без добавок, показала посередні показники, з періоду 7-го дня до 14-го вміст білка зріс з **344** мг/г до **372,6** мг/г, що складає приріст у **8,2%**. За останній тиждень контрольна група мала прибавку лише в **0.75%**.

Група Т — група, якій в якості харчової добавки в корм додавали базальтовий туф, за перший тиждень мала зріст вмісту білка з **334,9** мг/г до **371,9**, що складає **11%** від початкового значення. За третій тиждень вміст білка суттєво не змінився.

Група П - група, якій давали вільний ферментний препарат мала найбільший приріст вмісту білка за перший тиждень. Таким чином з початкового вмісту **352,4** мг/г вміст збільшився до **395,4** мг/г. З періоду 7-14 дня приріст складав **12,2%**, що свідчить про ефективне засвоєння білка дослідними рибами. Даний приріст є теоретично очікуваним, «Протосубтилін А120» - це комплексний ферментний препарат, якій містить нейтральні та лужні протеази, які гідролізували високополімерні сполуки білка корму до легкозасвоюваних пептидів та амінокислот.

Проте за третій тиждень нами було зафіксовано зниження вмісту білка до **380,2** мг/г. Згідно огляду літератури, даний ферментний комплекс використовується в тваринництві, додавання ферментного препарату до водного середовища створює ризики вимивання даної харчової добавки, щоб запобігти цьому, ми використовували метод іммобілізації.

Група Т+П — дослідна група, яка отримувала іммобілізований ферментний препарат в якості харчової добавки, за перший тиждень мала приріст вмісту білка з **345** мг/г до **360,4** мг/г, приріст складав лише **4,5%**, що значно менше в порівнянні з іншими дослідними групами. Проте, за останній тиждень вигодовування, дослідна група показала найвищий приріст за період

з 2-го до 3-го тижня, якій складав **10,4%**. На 21-у добу, вміст білка був найбільший серед усіх груп та складав **397,9** мг/г.

Використання базальтового туфу та протосубтиліну дало синергічний ефект, даний результати відповідають теоретичним очікуванням. Імобілізація на базальтовому туфі покращує стабільність та ефективність протеолітичних ферментів, також запобігає вимиванню ензимів. Найкраще себе показала група Т+П, в якій спостерігався найбільший вміст білка на грам тканини (397,9). З періоду 7 до 21 дня, приріст концентрації білка складав 15,36%. В м'язах риб групи П концентрація складала 380,2 мг/г тканини, приріст за період експерименту 7,95%.

Отже, дослідження показали, що використання комплексного ферментного препарату «Протосубтиін А120» покращує засвоєння білків гранульованого корму. Імобілізована форма даного препарату показала кращі показники, ніж вільна.

3.4 Визначення загальних ліпідів в м'язах риб

Ліпіди є важливими компонентами тканин риб, вони виконують наступні функції: енергетичну, структурну, метаболічну та регуляторну У м'язовій тканині загальні ліпіди представлені як триацилгліцеролами так і структурними фосфоліпідами, що входять до складу клітинних мембран.

Також ліпіди використовуються як енергетичний субстрат, який використовується за несприятливих умов. Щоб оцінити рівень надходження ліпідів з дослідного корму, ми колориметричним методом вимірювали вміст в дослідних пробах та перераховували на грам тканини. Результати зображені на рисунку 3.4.

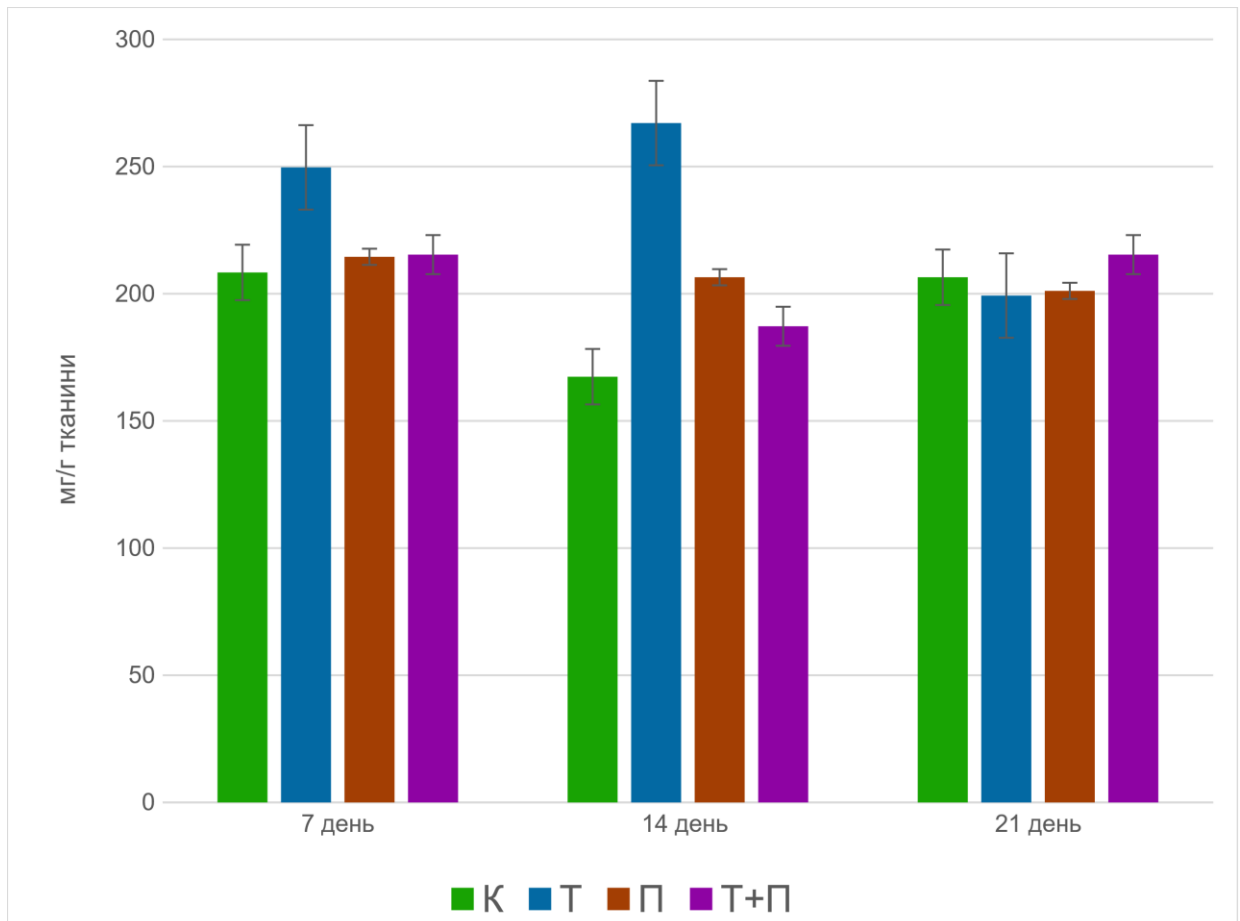


Рис 3.4. Вміст загальних ліпідів в м'язовій тканині *Carassius gibelio* за умов вигодовування дослідними кормами (мг/г тканини)

Аналіз вмісту ліпідів показав:

Група К — у дослідних *Carassius gibelio*, які споживали гранульований комбікорм спостерігається зниження вмісту загальних ліпідів за перший тиждень з 208 мг/г до 167,37 мг/г, що складає **-19,5%**. За третій тиждень досліді спостерігався зріст концентрації ліпідів, в 23.3% кінцеві значення якої дорівнювали 206,46 мг/г.

Група Т — у дослідній групі, якій давали базальтовий туф, має високі початкові показники в 249,66 мг/г за перший тиждень та 267 мг/г за другий. З 7-ої по 14-у добу, приріст складав **6,97%**. Проте за останній тиждень досліді дослідні риби втратили 25,47% ліпідів в м'язах. Під кінець експерименту значних змін між дослідними групами не спостерігалось. Базальтовий туф

багатий на мінерали, що в довгостроковій перспективі може вплинути на травлення дослідних риб.

Група П — Дослідна група, яка споживала ферментний препарат, показала відносно стабільний вміст загальних ліпідів у м'язовій тканині. Ліпіди використовуються як резервне джерело енергії, вони накопичуються в м'язовій тканині та можуть бути мобілізовані в енергетичні процеси за потреби. Відсутність різких втрат ліпідів може свідчити про те, що організм дослідних риб отримував необхідні кількості нутрієнтів з корму.

Група Т+П — у групі в якій використовували іммобілізований протосубтилін спостерігається зниження концентрації на 13% за перший тиждень та зріст на 13% за другий. В загальному концентрація ліпідів не змінилась. В порівнянні з іншими дослідними групами та контролем суттєвих відмінностей немає. Це пояснюється тим, що «Протосубтилін А120» містить в основному протеази, які гідролізують білкові молекули.

Отже, використання іммобілізованого ферментного препарату «Протосубтилін А120» на базальтовому туфі є доцільним та ефективним, розробка кормів з додаванням даної харчової добавки може покращити показники приросту живої маси риб, вміст білка в м'язовій тканині, зменшити розхід корму. Сукупність цих факторів може збільшити продуктивність підприємства та знизити витрати.

ВИСНОВКИ

1. Середньодобовий відносний приріст маси *Carassius gibelio* за період експерименту є найбільшим в групах, вигодовування яких здійснювали кормом з додаванням протосубтиліну. Застосування протосубтиліну в іммобілізованій на базальтовому туфі формі викликає підвищення даного показника до 0,75%, у вільній формі – 0,61%.

2. Коефіцієнт конверсії корму для риб, що вигодовувались з додаванням іммобілізованого протосубтиліну є найменшим серед досліджуваних груп та сягає значення 3,32.

3. Вміст білка в м'язах риб, що отримували корм з додаванням вільного протосубтиліну більший за контрольні значення на 14у добу експерименту, іммобілізованого – на 21у добу. Вміст ліпідів у вказаних групах риб не відрізнявся від контролю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кобаса І.М., Цимбалюк В.В. (2016) Природний мінерал базальтовий туф: склад, властивості та використання: монографія. Чернівці : Чернівецький нац. ун-т ім. Юрія Федьковича, 200 с.
2. Щепетільников, Ю. О. (2020). Використання ферментних препаратів для підвищення захисних функцій та зниження стресового впливу у телят. Вісник аграрної науки Причорномор'я, 24(2), 80–86. doi: 10.31521/2313-092X/2020-2(106)-9
3. Agboola, J. O., Oluwasola, O. A., & Adeyemi, O. O. (2022). Effects of dietary enzymes on growth performance, nutrient digestibility, and gut health in broilers: A review. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 916473. doi: 10.3389/fvets.2022.916473
4. Chen, S., Maulu, S., Wang, J., Xie, X., Liang, X., Wang, H., Wang, J., & Xue, M. (2023). The application of protease in aquaculture: Prospects for enhancing the aquafeed industry. *Animal Nutrition*, 16, 105-121. doi: 10.1016/j.aninu.2023.11.001
5. Coutinho, T. C., Tardioli, P. W., & Farinas, C. S. (2020). Phytase immobilization on hydroxyapatite nanoparticles improves its properties for use in animal feed. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(1), 270–292. doi: 10.1007/s12010-019-03116-9
6. Dillon, G. P., Gaffney, M. A., Curran, C. M., & Moran, C. A. (2017). Dietary safety of a dual-enzyme preparation for animal feed: Acute and subchronic oral toxicity and genotoxicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88, 106–117. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.06.001
7. Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509. doi: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5

8. Froese, R., & Pauly, D. (2025). *Carassius carassius*. In FishBase. Retrieved June 11, 2025, from <https://www.fishbase.ca/summary/6376>
9. Gong, T., Ji, M., Yang, Y., Liu, J., Gong, Y., Liu, S., Zhao, Y., Cao, G., Guo, X., Yang, Y., & Li, B. (2024). Enzymatically hydrolyzed diet improves growth performance and intestinal microbiome in growing pigs. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1485017. doi: 10.3389/fnut.2024.1485017
10. Gupta, N., Raj, A., & Sharma, S. (2025). Recent advances in enzyme immobilization techniques: Implications for industrial applications. *Molecules*, 30(4), 939. doi: 10.3390/molecules30040939
11. Hofer, R. (1982). Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 72(1), 55–63. doi: 10.1016/0300-9629(82)90010-x
12. Jiao, F., Zhang, L., Limbu, S. M., Yin, H., Xie, Y., Yang, Z., Shang, Z., Kong, L., & Rong, H. (2023). A comparison of digestive strategies for fishes with different feeding habits: Digestive enzyme activities, intestinal morphology, and gut microbiota. *Ecology and Evolution*, 13(9), e10499. doi: 10.1002/ece3.10499
13. Junger, H., Kotrschal, K., & Goldschmid, A. (1989). Comparative morphology and ecomorphology of the gut in European cyprinids (Teleostei). *Journal of Fish Biology*, 34(2), 315–326. doi: 10.1111/j.1095-8649.1989.tb03312.x
14. Kader, M. A., & Gosh, S. K. (2019). Effects of dietary supplementation of exogenous enzymes on nutrient digestibility and growth of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Reports*, 14, 100213. doi: 10.1016/j.aqrep.2019.100213
15. Kaur, R., & Sekhon, B. S. (2012). Enzymes as drugs: An overview. *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 3(2), 29.
16. Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: a comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*, 45, Article 207. doi: 10.1186/s42269-021-00649-0

17. Liang, Q., Yuan, M., Xu, L., Lio, E., Zhang, F., Mou, H., & Secundo, F. (2022). Application of enzymes as a feed additive in aquaculture. *Marine Life Science & Technology*, 4(2), 208–221. doi: 10.1007/s42995-022-00128-z
18. Luo, L., Zhang, J., & Chen, S. (2014). Immobilization of protease on natural mineral carriers and its application in aquatic feed. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 105, 18–24. doi: 10.1016/j.molcatb.2014.02.002
19. Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E.-S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS Omega*, 8(6), 5184–5196. doi: 10.1021/acsomega.2c07560
20. Ojha, B. K., Singh, P. K., & Srivastava, N. (2019). Enzymes in the animal feed industry. In V. Kuddus (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 93–109). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00007-4
21. Opiyo, M. A., Jumbe, J., Ngugi, C. C., & Karisa, H. C. (2019). Different levels of probiotics affect growth, survival and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in low input ponds. *Scientific African*, 4, e00103. doi: 10.1016/j.sciaf.2019.e00103
22. Senthilkumar, P., Ravikumar, G., & Koland, M. (2013). The classical sulfo-phospho-vanillin assay adapted for microplate reader: quantitation of lipids in meibum. *Journal of Basic and Applied Biomedical Science*, 2(1), 15–22. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3637422/>
23. Shang, M., & Wang, Y. (2017). Effects of dietary basalt powder supplementation on growth performance and antioxidant capacity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 23(5), 1105–1112. doi: 10.1111/anu.12413
24. Sila, A., Dierckens, K., Rombaut, G., & Sorgeloos, P. (2013). The use of exogenous enzymes in aquafeeds: A review. *Aquaculture*, 412-413, 1–10. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.07.033
25. Solovyev, M. M., Kashinskaya, E. N., Izvekova, G. I., & Glupov, V. V. (2015). pH values and activity of digestive enzymes in the gastrointestinal

- tract of fish in Lake Chany (West Siberia). *Journal of Ichthyology*, 55(3), 251–258. doi: 10.1134/S0032945215010208
26. Smith, J., Doe, A., & Lee, H. (2022). Enzyme immobilization strategies for the design of robust and reusable biocatalysts. *Journal of Bioprocess Engineering*, 10(1), 1–15. doi: 10.1016/S2452-2236(22)00005-0
27. Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1-4), 146–158. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.015
28. Ugwuanyi, J. O. (2016). Enzymes for nutritional enrichment of agro-residues as livestock feed. In *Agro-industrial wastes as feedstock for enzyme production* (pp. 233–260). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-802392-1.00010-1
29. Yuan, X., Peng, M., & Liang, M. (2015). Effects of dietary protease supplementation on growth, digestive enzyme activity, and immune response of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 46, 253–260. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.013

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А**Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях**

Дозволяється працювати лише на заземлених об'єктах.

Приміщення хімічних лабораторій обладнуються вентиляцією, а місця можливого накопичення шкідливих хімічних речовин – відсмоктувачами.

Підлоги лабораторій повинні мати рівну, неслизьку, зручну для очищення поверхню, бути стійкими до дії механічних навантажень, вологи і агресивних середовищ.

Кожен працівник у лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце.

Перед початком роботи слід одягти спецодяг (халат).

У спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторії.

При можливості скляний посуд і скляні частини замінюють пластиковими.

Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах, їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.

При переливанні рідин (крім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

При розведенні речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- усю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;

- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;

- при приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;

- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями;

- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації.

При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт та ін.) дотримуються такої вимоги:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при ввімкненій вентиляції, вимкнених газових пальниках і нагрівальних електроприладах.

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогнебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;

- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра.

Після закінчення роботи із шкідливими речовинами необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом.

Забороняється використовувати речовини без етикеток та із закінченим терміном зберігання;

Після закінчення роботи необхідно вимити та висушити посуд, прибрати робоче місце, провітрити приміщення, відключити всі нагрівальні та освітлювальні прилади, закрити водопровідні та газові крани.

Категорично забороняється працювати в лабораторії одному.

Виходячи з лабораторії, обов'язково перевірити, чи вимкнені газ, вода, електроенергія.

Надання першої допомоги

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно вимкнути газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і, перекочуючи, збивати полум'я.

У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2 %-го KMnO_4 , а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змастити маззю від опіків.

При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3 % им розчином натрій гідрогенкарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2 %-им розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди, і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2 %-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті,

а далі змастити 5 %-им розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.