

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**РОЗРОБКА ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ КОРМОВОЇ ДОБАВКИ НА ОСНОВІ
ІММОБІЛІЗОВАНИХ ГІДРОЛАЗ ТА ОЦІНКА ЇЇ ЕФЕКТИВНОСТІ В
УМОВАХ АКВАКУЛЬТУРИ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконав:

студент 4 курсу, 407 групи
спеціальності 162 «Біотехнології
та біоінженерія»

Худий Олександр Олександрович

Керівник:

кандидат біологічних наук, доцент
Чебан Л.М.

*До захисту допущено
на засіданні кафедри біохімії та біотехнології
протокол № _____ від _____ 2025 р.
Зав. кафедрою _____ доцент Волощук О.М.*

Чернівці – 2025

Анотація

Кваліфікаційна робота присвячена оцінці ефективності використання кормової добавки на основі ферментного препарату «Протосубтилін ГЗ×А-120», іммобілізованого на базальтовому туфі, при вирощуванні *Carassius gibelio* в умовах аквакультури. Встановлено, що 21-денне вигодовування дослідних риб кормом із додаванням іммобілізованої форми зазначеного ферментного препарату забезпечує максимальний рівень активності нейтральних та лужних протеїназ кишечника на 21-ий день експерименту. Загальна протеолітична активність в кислому діапазоні рН підвищена у порівнянні зі всіма дослідними групами протягом всього експерименту. Найвищі показники ліполітичної активності зафіксовано в групі з іммобілізованим ферментом, де рівень активності ліпаз перевищував контроль на 31 % (7-й день), 37 % (14-й день) та 40 % (21-й день). В свою чергу, застосування досліджуваних кормових добавок не призвело до змін рівня амілолітичної активності кишечника карася сріблястого протягом усього періоду вигодовування.

Ключові слова: ферментний препарат, кормова добавка, *Carassius gibelio*, Протосубтилін ГЗ×А-120, протеїнази, α -амілаза, ліпази.

Abstract

The qualification work is devoted to the evaluation of the effectiveness of the use of a feed additive based on the enzyme preparation “Protosubtilin G3x A-120” immobilized on basalt tuff in the cultivation of *Carassius gibelio* in aquaculture. It has been established that 21-day feeding of experimental fish with food containing the immobilized form of the mentioned enzyme preparation provides the maximum level of activity of neutral and alkaline intestinal proteinases on the 21st day of the experiment. The total proteolytic activity in the acidic pH range was increased compared to all experimental groups throughout the experiment. The highest rates of lipolytic activity were recorded in the group with immobilized enzyme, where the level of lipase activity exceeded the control by 31% (day 7), 37% (day 14) and 40% (day 21). In turn, the use of the studied feed additives did not lead to changes in the level of intestinal amylolytic activity of silver carp during the entire period of feeding.

Key words: enzyme preparation, feed additive, Carassius gibelio, Protosubtilin G3xA-120, proteinases, α -amylase, lipases.

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

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Функціональні кормові добавки та їх застосування в аквакультурі.....	7
1.2. Вплив ферментних препаратів на гідролітичну активність кишківника риб	10
1.3. Властивості базальтових туфів та перспективи їх використання як носіїв для ферментних препаратів.	15
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	19
2.1. Об'єкти та матеріали досліджень	19
2.2. Методи досліджень	22
2.2.1. Приготування дослідного корму	22
2.2.2. Отримання дослідного матеріалу	23
2.2.3. Визначення вмісту загального протеїну за методом Лоурі.....	23
2.2.4. Визначення рівня протеолітичної активності модифікованим методом Ансона.....	24
2.2.5. Визначення амілолітичної активності методом Каравея	25
2.2.6. Уніфікований метод визначення активності ліпази	26
2.2.7. Статистична обробка експериментальних даних	27
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	28
ВИСНОВКИ	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	39
ДОДАТКИ	44

ВСТУП

Годівля риб в аквакультурі є одним з найважливіших аспектів, що визначає продуктивність даного виду господарської діяльності. Окрім того, цей процес формує основу вартості утримання господарства. Так, до 70% усіх витрат припадає на закупівлю ефективних кормів для швидкого росту та розвитку риби.

Для здешевлення вартості рибної продукції, замість традиційного і дороговартісного рибного борошна, як основу гранульованого корму часто використовують різні замітники, створені на основі рослинної сировини, такі як соєве, пшеничне чи кукурудзяне борошно. Однак, таке рішення несе за собою ряд проблем, пов'язаних з важкодоступністю поживних речовин рослинного походження для організму риби. Це, в свою чергу, може викликати погіршення показників набору маси і привести до збільшення кількості використаного корму, що може бути нерентабельним для власників господарств.

Враховуючи зазначене, постає нагальна потреба у створенні недороговартісних кормів, що забезпечуватимуть підвищення ефективності рибогосподарської діяльності шляхом пришвидшення набору маси, підвищення рівня виживаності молоді та покращення імунітету риб. Вирішенням даної проблеми може бути внесення до існуючих кормів різноманітних кормових добавок, серед яких виділяють ферментні препарати. Внесення їх до корму, зокрема різних гідролаз, дозволяє збільшити доступність поживних речовин, що, в свою чергу, призводить до інтенсифікації росту риб та покращення їх метаболізму. Окрім того, дані сполуки не є дороговартісними, є нетоксичними і не акумулюються в організмі тварини, що може гарантувати безпеку виготовленої продукції для подальшого споживання.

Однак ефективність використання ензимних препаратів в аквакультурі значною мірою залежить від збереження їхньої активності у водному середовищі, де вони можуть швидко втрачати стабільність і біологічну дію.

Для подолання цієї проблеми доцільним є застосування технології іммобілізації ферментів — закріплення їх на твердих носіях природного походження. Одним із перспективних матеріалів у цьому контексті є базальтовий туф, який завдяки своїм фізико-хімічним властивостям (пористість, хімічна інертність, велика площа поверхні) забезпечує стабільність та пролонговану дію ензимів.

Відповідно, метою нашої роботи стало оцінити ефективність використання кормової добавки на основі ферментного препарату «Протосубтилін ГЗ×А-120», іммобілізованого на базальтовому туфі, при вирощуванні *Carassius gibelio* в умовах аквакультури.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Визначити рівень протеолітичної активності в гомогенаті кишечника *Carassius gibelio* в кислому, нейтральному та лужному діапазоні рН при тритижневому вигодовуванні кормом з додаванням іммобілізованого на базальтовому туфі ферментного препарату «», ферментного препарату без носія та базальтового туфу без ензиму.

2. Визначити рівень амілолітичної активності в гомогенаті кишечника *Carassius gibelio* за умов вигодовування кормом з додаванням вищевказаних добавок.

3. Оцінити зміни ліполітичної активності в гомогенаті кишечника *Carassius gibelio* залежно від складу раціону.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Функціональні кормові добавки та їх застосування в аквакультурі.

Протягом останніх десятиліть саме аквакультура стала сектором, що найінтенсивніше розвивається в сфері виробництва продуктів харчування. У 2014 році, вперше частка отриманої в умовах аквакультури харчової риби в загальних обсягах перевищила частку виловленої в Світовому океані. Подальше зростання чисельності населення планети з часом лише збільшить попит на рибну продукцію, тому вважається, що ресурсна база Світового Океану, в майбутньому, не матиме змоги в повній мірі задовільнити потреби людства у рибній продукції.

Індустрія аквакультури значною мірою покладається на якісні корми, які у своєму складі будуть містити всі основні поживні речовини (білки, жири, вуглеводи, різні мікронутрієнти, такі як, вітаміни, антиоксиданти та ін.) та повинні обов'язково бути збалансовані між собою для забезпечення швидкого росту, максимального виживання особин та забезпечення стабільного та своєчасного відтворення [5].

Одним із основних складників гранульованих кормів, що використовуються в аквакультурі є рибне борошно, вироблене з виловленої в природніх умовах риби. Дане борошно вважається найефективнішим джерелом білка для рибних організмів. Однак брак ресурсів і зростання цін серйозно обмежують використання рибного борошна в аквакультурі.

З метою здешевлення гранульованих кормів замість рибного борошна, як основного субстрату, часто використовують замітники, створені на основі рослинної сировини. Однак використання рослинного білка для аквакультури риби стикається з низкою проблем через небажані характеристики, включаючи незбалансовані амінокислотні профілі та антипоживні фактори, які можуть вплинути на продуктивність росту, використання корму, засвоюваність та загальний стан здоров'я риби.

Станом на сьогоднішній день описані проблеми вирішуються шляхом включення до складу кормів функціональних кормових добавок.

Функціональні кормові добавки — це інгредієнти, які не лише покривають базові поживні потреби, а й сприяють покращенню росту, зміцненню імунітету, підвищенню стійкості до захворювань і, водночас, забезпечують економічну й екологічну ефективність. До основних типів ФКД належать ферментні препарати, пробіотики, пребіотики, синбіотики, мікроводорості, фітогенні речовини (ефірні олії, екстракти рослин), імуностимулятори, атрактанти, органічні кислоти, а також інші речовини — парапробіотики, пігменти та інші сполуки [31]. Більшість з них мають природне походження і є джерелами біологічно активних речовин, безпечних для організму риби.

Серед зазначених типів ФКД особливо важливу роль відіграють ферментні препарати, які сприяють гідролізу біополімерів, підвищують активність ендогенних ферментів і компенсують їх нестачу, що особливо актуально для молоді або в умовах стресу.

Дані ефекти, у свою чергу, поліпшують економічно важливі показники виробництва. Зокрема, поживні речовини корму засвоюються ефективніше, що, в свою чергу, збільшує фактичну поживність раціону на 5–10%; зменшує витрати корму на одиницю продукції на 5–15%; збільшує продуктивність при незмінних раціонах. Використання ферментних препаратів також може дозволити замінити дорогі компоненти корму на дешевші без втрати продуктивності; зменшити рівень інфекційних захворювань і потребу в антибіотиках [35].

У практиці застосовують як моноензимні, так і мультиензимні препарати.

Моноензимні — до складу препарату входить лише один ензим (наприклад: амілаза, ліпаза, протеаза, фітаза або інший фермент, який є найнеобхіднішим), що діє лише на конкретний субстрат;

Мультиензимні (поліферментні, мультиферментні) – в складі препарату три і більше ферментів в різному поєднанні та співвідношенні [29].

Останні, в свою чергу, є більш популярними через низку переваг: ензими підібрані в оптимальному співвідношенні, посилюючи активності один одного, активні в широкому діапазоні рН і температур, краще розподіляються в кормі та загалом економічно вигідніші, ніж окремі ферменти.

Ефективність таких препаратів підтверджується на практиці. Зокрема, при додаванні мультиферментного препарату з ліпазою до раціону молоді білуги (*Huso huso*) спостерігалось підвищення специфічного приросту маси (SGR) з $3,32 \pm 0,19$ до $3,68 \pm 0,17$, а також зростання середньої маси особин з $46,13 \pm 0,20$ г до $53,03 \pm 0,15$ г. Вміст жиру в молоді *Huso huso* теж значно збільшився ($34,53\% \pm 0,06\%$, контроль $27,83\% \pm 1,75\%$) [15].

Ще однією важливою проблемою рослинних білків є зниження смакових якостей корму, що може спричинити відмову риби від споживання. Відповідно, додавання специфічних кормових добавок, а саме атрактантів, у такі раціони вважається одним із найефективніших способів покращити споживання корму. Численні дослідження підтвердили, що деякі специфічні речовини, такі як амінокислоти (L-амінокислоти та таурин тощо), основи четвертинного амонію (бетаїн, гліцин, пролін, холін та вітамін тощо), а також природні стимулятори годівлі (борошно з синіх мідій), гідролізат криля, рибне борошно, лялечки шовкопряда, дощові черв'яки, китайські трави та морські водорості тощо) є потужними атрактантами у водному кормі [18].

Зокрема бетаїн (триметилгліцин), синтезований шляхом окислення холіну є одним із найпопулярніших атрактантів у сучасній аквакультури. В основному його отримують в результаті переробки цукрових буряків. Цікаво, що дана сполука підвищує продуктивність росту, засвоюваність гранульованого корму, а також покращує якість м'яса та імунітет риб. За рахунок посилення споживання корму рибою, мінімізуються його втрати, що запобігає забрудненню води його залишками. Це, в свою чергу, унеможливорює

процеси отруєння водного середовища сполуками амонію, утвореними внаслідок розкладання корму у воді.

Слід зазначити, що бетаїн діє як кормовий атрактант через стимуляцію нюхової цибулини, що забезпечує посилення апетиту риби. Це веде за собою істотний приріст біомаси вигодовуваних ним особин. Крім того, бетаїн діє як донор метильних груп, беручи участь у синтезі важливих метаболітів — метіоніну, карнітину, фосфатидилхоліну, креатину, а також у білковому й енергетичному обміні. Його також вважають ліпотропним фактором із гепатопротекторною дією [17].

1.2. Вплив ферментних препаратів на гідролітичну активність кишківника риб.

Ферментні препарати — це екзогенні ферменти, які додають до раціонів з метою покращення перетравлення компонентів корму, особливо рослинного походження, що містять антипоживні речовини (наприклад, фітинову кислоту, некрахмальні полісахариди) [26]. Як зазначалося раніше, в умовах переходу аквакультури на умовно рослинні раціони, ферментні добавки стають незамінними, адже допомагають гідролізувати складні білки, вуглеводи та фосфорові сполуки, які риби не можуть повноцінно засвоїти без сторонньої допомоги [39].

Так, у сучасній практиці як кормові добавки в аквакультурі дедалі частіше використовують екзогенні ферменти класу гідролаз — протеази, амілази та ліпази [13].

Говорячи про протеази варто зазначити, що це ферменти, що гідролізують пептидні зв'язки в білках, розщеплюючи їх до пептидів і амінокислот [1]. Екзогенні протеази, додані до корму, можуть компенсувати недостатню секрецію ензимів у травному тракті риб і допомагати ендогенним ферментам повніше перетравити білкові компоненти корму. Це, в свою чергу, підвищує коефіцієнт засвоюваності протеїну.

Сучасні дослідження демонструють, що додавання протеаз суттєво поліпшує перетравність білка і сприяє росту риб. Наприклад, введення

бактеріальної протеази до раціону райдужної форелі підвищувало коефіцієнт перетравності білка з ~79% до ~87% [14].

Крім того, добавки, що містять у своєму складі протеази дозволяють успішно знижувати частку рибного борошна і загального протеїну в кормах без погіршення продуктивності. Зокрема, в експериментах з молоддю тилapia екзогенна протеаза (250 од/кг корму) компенсувала зменшення рівня рибного борошна та білка в раціоні, забезпечивши аналогічні або кращі прирости і коефіцієнти конверсії корму. У цих же дослідках протеаза стимулювала метаболічну активність: спостерігалось підвищення експресії гену інсуліноподібного фактору росту-I (IGF-1) в тканинах, що вказує на покращення гормональної регуляції росту під впливом ферментної добавки [16].

Механізм дії екзогенних протеаз полягає в попередньому гідролізі білків корму, що полегшує роботу ендогенних ензимів та підвищує біодоступність амінокислот. Окрім того, деякі екзогенні протеази також можуть руйнувати антипоживні фактори білкової сировини (наприклад, інгібітори протеаз рослинного походження), додатково покращуючи якість корму.

Важливо відзначити, що ефективність протеазної добавки залежить від її властивостей і способу введення. Одна й та сама протеаза може давати різний ефект залежно від складу базового раціону та технології приготування корму. Тому, при застосуванні протеаз в кормах необхідно враховувати як вид риби, склад дієти, так і спосіб виготовлення комбікорму.

Як окремий приклад, рослинні протеази, зокрема папаїн, знаходять застосування як ефективні ензимні добавки. Папаїн – це протеаза з плодів папаї, яка здатна розщеплювати білки з високою активністю, перевершуючи за ефективністю навіть пепсин і панкреатин [39]. У дослідженні з молоддю *Labeo rohita* його додавання (1–5%) сприяло зростанню маси, покращенню коефіцієнта конверсії корму та білкової засвоюваності, а також посиленню активності кишкових ферментів (протеази та ліпази). Це вказує, що екзогенна протеаза не лише сама по собі гідролізує корм, а й може стимулювати травну

систему риби до активнішої секреції або забезпечувати вищу загальну ферментативну активність у кишечнику [39].

Окрім того, папаїн позитивно вплинув на фізіологічний стан риби: під його впливом зросла активність антиоксидантних ензимів печінки (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази), що свідчить про зниження оксидативного стресу у риби. Таким чином, протеазні препарати (як мікробного, так і рослинного походження) при належному дозуванні здатні оптимізувати білкове живлення риби, посилюючи гідроліз білків у кишечнику і одночасно покращуючи ростові показники та здоров'я риби.

Амілази, в свою чергу, каталізують гідроліз крохмалю та інших полісахаридів до простих цукрів (глюкози та олігосахаридів). Як відомо, у багатьох хижих видів риби (лососеві, окуневі), активність ендогенної амілази обмежена, оскільки в природі їх раціон характеризується високобілковою дієтою [23]. Відповідно, низька амілазна активність призводить до слабкого засвоєння крохмалю і може спричинити метаболічні порушення при високовуглеводних дієтах. Тому додавання екзогенних амілаз у корм розглядається як можливість поліпшення вуглеводного обміну у низки хижих видів риби.

Включення екзогенної амілази до раціону риби підвищує перетравність крохмалю та нормалізує метаболізм глюкози у риби. Так, дослідження демонструють, що додавання α -амілази (50 мг/кг) до раціону коропових призводить до різкого зростання запасів глікогену в печінці (з ~ 97 до ~ 171 мг/г тканини) та підвищення рівня глюкози в крові (з ~ 80 до ~ 102 мг глюкози в 100 мл крові) порівняно з контрольними групами [22]. Відповідно можна стверджувати, що під дією екзогенної амілази засвоєння крохмалю як джерела енергії покращилось, і більше глюкози накопичувалося у вигляді глікогену.

Окрім поліпшення енергетичного обміну, екзогенні амілази можуть позитивно впливати на білковий обмін, здоров'я та імунітет риби. Посилене засвоєння вуглеводів за рахунок амілази дозволяє спрямувати більше білків корму на інтенсифікацію ростових процесів, а не на покриття енергетичних

потреб. У досліді на *Pangasianodon hypophthalmus* додавання амілази призвело до збільшення вмісту білка в м'язах риб та підвищення співвідношення білок/ДНК в м'язовій тканині, що вказує на посилений синтез білка і його накопичення в м'язовій тканині. Також у цих риб покращилися гематологічні показники: зросла кількість еритроцитів і лейкоцитів, гематокрит, число лімфоцитів, що свідчить про зміцнення імунної системи під впливом споживання екзогенної амілази [21].

Ліпази – ферменти класу естераз, які гідролізують жири (тригліцериди), послідовно розщеплюючи їх на гліцерин та вільні жирні кислоти. У риб серед ліполітичних ферментів найважливішими є панкреатична ліпаза та фосфоліпаза А₂. Вони відіграють ключову роль у засвоєнні жирових компонентів корму, впливають на жирові відкладення в організмі.

Слід зазначити, що особливістю травлення ліпідів у риб є те, що молодь риб, зазвичай, краще засвоює фосфоліпіди, тоді як перетравлення тригліцеридів обмежене і нелінійно залежить від дози жирів в кормі. Тому у випадку високоліпідних раціонів або при годівлі риб на ранніх стадіях розвитку може виникати дефіцит ендогенної ліпази [38].

Добавки екзогенних ліпаз у корм дозволяють підвищити рівень гідролізу жирів у кишечнику та, тим самим, покращити їх засвоєння. Як зазначалося раніше, додавання мікробної ліпази до корму молоді *Huso huso* забезпечило вищі темпи росту: специфічна швидкість росту (SGR) зросла з ~3,32 до ~3,68%/день, а кінцева маса – з 46,1 г до 53,0 г за період досліду. Окрім того, вміст жирових відкладень з ~27,8% до ~34,5% від сирової маси. При цьому зросли і показники вмісту поліненасичених ω -3 жирних кислот в м'язах: рівень ейкозапентаєнової (ЕРА) та докозагексаєнової (ДНА) кислот у риб, що отримували 500 мг/кг ліпази, був 5,05% та 5,89% відповідно, тоді як у контролі – лише 1,52% і 4,12% відповідно [15].

Подібним чином додали до раціону каспійського лосося (*Salmo trutta caspius*) мультиферментну комерційну суміш, що містить ліпази. Рівень виживання та середня маса тіла риби були вищими, ніж у контрольній групі, з

підвищенням рівня на 5,85% та 24,06% відповідно. Ці дослідження підтвердили, що екзогенна ліпаза може сприяти збільшенню росту риби шляхом збільшення SGR [8].

Слід також зазначити, що ліпазні добавки можуть посилювати метаболічну активність та імунний статус кишечника. Так, у молоді білого амура (*Stenopharyngodon idella*) додавання ліпази в корм спричинило збільшення відносної маси кишечника та покращення коефіцієнта ефективності корму (з ~57,7% до ~63,7%). Крім того, в кишечнику цих риб зросла активність імунної системи: підвищилися рівні протизапального цитокіну інтерлейкін-10 та кислій фосфатази (маркер фагоцитарної активності) на ~7–8% [24].

Крім описаних ферментів, також часто додають до раціону риб фітази. Вони необхідні для перетравлення рослинних фітатів, що в результаті підвищує доступність фосфору та інших мінералів, паралельно збільшуючи приріст біомаси тварин [19, 27].

Враховуючи зазначене можна стверджувати, що при підборі певного ферментного препарату важливо досконало знати якісний та кількісний склад корму, до якого буде додаватися моно- або поліензимний препарат. Це пояснюється тим, що залежно від виду сировини з якої готується корм, підбираються ензими, що максимально зможуть гідролізувати поживні речовини обраної сировини.

Також варто зазначити, що підбір ферментів, що використовуватиметься в якості кормової добавки, буде також залежати від стадії розвитку рибного організму. Це пояснюється тим, що всі ферменти мають свій власний оптимум дії. Тобто, їх каталітична активність може змінюватися відповідно до рН середовища, в якому вони перебувають. Як відомо, сам травний апарат і його функціональність поступово розвиваються в міру розвитку молоді риби. рН шлунку цих організмів є однією з найбільших змін, що відбуваються під час росту тварини. На початку рН шлунку молоді є нейтральним або слабо лужним (6,7–7,1), однак в міру росту показники рН поступово зменшуються і через 97

днів від вилуплення воно може сягати значення 5,0. Відповідно, на різних етапах розвитку риби, як кормові добавки необхідно давати ферментні препарати з різною кислотостійкістю, в залежності від стадії розвитку організму [18].

Окрім того, для забезпечення нормальної каталітичної активності ферментних препаратів важливо враховувати умови, за яких буде готуватися та гранулюватися корм з їх додаванням. За рахунок білкової природи ензимів, застосування високих температур при виготовленні корму може суттєво вплинути на подальшу активність та кількість ферменту. Це пов'язано з тим, що кожен фермент має свій певний температурний оптимум при якому вони проявляють свою максимальну активність. Також при високій температурі (понад 55°C) буде спостерігати денатурація ферменту, внаслідок чого ензим втратить свої каталітичні властивості [6].

1.3. Властивості базальтових туфів та перспективи їх використання як носіїв для ферментних препаратів.

Імобілізація ферментів — це метод прикріплення ензимів на нерухомій твердій основі (носії) з метою обмеження їхньої рухливості без втрати каталізаторної активності. Основною перевагою такого підходу є підвищення стабільності ферментів у несприятливих зовнішніх умовах. Вільні ферменти надзвичайно чутливі до денатурації під впливом високих температур, екстремальних значень рН, протеїназ або інших денатуруючих чинників. Натомість іммобілізовані ензими демонструють вищу стійкість до цих факторів, включаючи детергенти та органічні розчинники [10].

Однією з причин такої стабільності є те, що носій, до якого прикріплюється фермент, може фізично підтримувати його третинну структуру, запобігаючи повній денатурації. У результаті іммобілізовані ферменти довше зберігають активність та функціонують у ширшому діапазоні умов середовища.

В свою чергу, важливою умовою здійснення успішної іммобілізації ферменту є правильний вибір методу іммобілізації та носія. Для іммобілізації

ферментів можуть використовуватися різні носії (органічні та неорганічні), що зумовлено їхньою хімічною будовою та різними методами, такими як зшивання, фізична адсорбція, захоплення та ковалентне зв'язування.

Одним із найпростіших і економічно вигідних способів є фізична адсорбція, при якій молекули ферменту утримуються на поверхні носія за допомогою електростатичних сил, а також водневих, гідрофільних/гідрофобних взаємодій, Ван-дер-Ваальсових та іонних зв'язків. Попри відносну слабкість кожного окремого зв'язку, їх сукупна дія забезпечує надійне утримання ферменту та збереження його високої каталітичної активності [7].

У пошуку ефективних і доступних носіїв для іммобілізації ферментів дедалі більше уваги приділяється мінералам природного походження, зокрема вулканічним туфам. Це осадові породи, що утворилися внаслідок ущільнення та зцементування продуктів вулканічних вивержень — попелу, піску, лапілів, вулканічних бомб і уламків гірських порід. Залежно від складу й походження туфи поділяють на базальтові, андезитові, ліпаритові тощо. Класифікація також можлива за розмірами пірокластичних фрагментів — від дрібного попелу (<2 мм) та лапілів (64–2 мм) до блоків та бомб (> 64 мм) [32].

Особливий інтерес становлять базальтові туфи — пористі породи, сформовані з базальтового попелу та лавових уламків. Їх унікальна структура обумовлена наявністю цеолітових мінералів (зокрема анальциму, клиноптилоліту) та глинистих домішок, які забезпечують високу питому поверхню й численні активні центри для адсорбції біомолекул [2].

Окрім того, за результатами досліджень, базальтові туфи з України мають удвічі вищу адсорбційну здатність, ніж чистий базальт або природний цеоліт. Це зумовлено їхньою пористою структурою та мінералогічною різноманітністю, що створює багато гетерогенних ділянок для зв'язування ферментів [37].

З огляду на ці властивості, базальтові туфи відповідають основним критеріям, що висуваються до носіїв для іммобілізації ферментів: доступність,

низька вартість, висока площа поверхні, хімічна та термічна стабільність, відсутність токсичності. Наявність природних цеолітів зумовлює також іонообмінні властивості, що можуть додатково сприяти фіксації ферментів на поверхні туфу.

Слід також зазначити, що іммобілізація ферментів на таких носіях є особливо актуальною для аквакультури, де важливо забезпечити стабільну дію ензимів у жорстких умовах середовища. По-перше, фіксація ферменту на носії може захистити його від термічної деструкції під час високотемпературної обробки при виробництві кормів (грануляції чи екструзії). По-друге, іммобілізовані ферменти демонструють стійкість до агресивного впливу шлункового середовища в травному тракті риб. Іммобілізовані системи здатні протистояти низькому рН шлунку і протеолітичним ферментам кишківника, доставляючи активний ензим до потрібного відділу травної системи риби.

Наприклад, було встановлено, що іммобілізація протеази у матриці з альгінату та бентоніту дозволила підвищити її активність у кишечнику риб на 27% порівняно з вільним ензимом [34].

Отже можна підсумувати, що іммобілізація підвищує ефективність використання ферментів: іммобілізовані ензими довше зберігають активність при зберіганні, краще витримують коливання рН і температури, а також менше піддаються автолізу чи протеолізу з боку інших ферментів. Застосування базальтового туфу як матриці пролонгованої дії дозволяє створити ферментні препарати, які поступово вивільняють активні ензими в кишечнику риб, при цьому не втрачаючи активності в кислому середовищі шлунка.

Окрім того, ще однією перевагою базальтових туфів як кормових добавок є те, що вони містять у своєму складі цінні мікроелементи (кальцій, магній, кремній тощо), що надає їм додаткову поживну функцію.

Також, перспективним напрямом є використання іммобілізованих ферментів на туфах у біоремедіації води в замкнених системах аквакультури. Закріплені на носії ензими можна використовувати для розкладання надлишків органіки (залишків корму, виділень риб) у воді. Завдяки іммобілізації фермент

не буде вимиватися і неактивуватися одразу у водному середовищі, а діятиме триваліший час. До того ж, сам базальтовий туф має корисні сорбційні властивості: його цеолітні компоненти здатні поглинати амоній та інші розчинені метаболіти, зменшуючи токсичне навантаження на організм риби та покращуючи якість водного середовища.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Об'єкти та матеріали досліджень

Дослідними об'єктами були риби виду карась сріблястий (*Carassius gibelio* Bloch, 1782), середня маса яких становила 50 г.

Карась сріблястий – представник родини корошових (Cyprinidae). Харчується даний вид, в природних умовах, як донними організмами (олігохетами та личинками комах), так і водними рослинами (зазвичай фітопланктоном). Окрім того, *Carassius gibelio* мають ряд особливостей, що роблять їх ідеальними об'єктами для досліджень: невибагливі до умов середовища існування; можуть жити при мінімальній кількості розчиненого кисню у воді; можуть існувати як в протічній, так і застійній воді; нерест порційний і відбувається, зазвичай, 3 рази на рік [36].

Дослідження проводили в умовах рециркуляційної системи лабораторії біотехнології гідробіонтів Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету ім. Юрія Федьковича.

Вигодовування відбувалося протягом 21 дня перегранульованими кормами з функціональними добавками. Як основу використовували комерційний корм для риб «Aller Bronze» діаметром гранул 3 мм. Як кормову добавку використовували ферментний препарат «Протосубтилін Г3х А-120». Як матрицю для іммобілізації ферментного препарату використовували подріблений базальтовий туф з родовища „Полицьке-ІІ” Рівненської області.

Сам корм «Aller Bronze» характеризується наступним компонентним складом: рибне борошно, риб'ячий жир, гороховий білок, соєве борошно, гемоглобін, рослинні олії, вітаміни і різноманітні мінеральні добавки.

Основні характеристики корму наведені у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

«Склад корму «Aller bronze»

Показники	Гранули, 3 мм
Сирий протеїн, %	45

Сирий жир, %	15
Вуглеводи, %	22,3
Зола, %	6, 5
Клітковина, %	3, 2
Фосфор в сухій речовині, %	1,1
Загальна енергія, МДж	21, 2
Засвоювана енергія, МДж	17, 6

До складу корму входить високоякісна сировина, яка відповідає європейським нормам та стандартам. Грануляція корму відбувається при гранично допустимих температурах, це дозволяє зберегти всі корисні речовини та вітаміни.

Протосубтилін ГЗ×А-120 – комплексний мультиензимний препарат, що синтезується культурою *Bacillus subtilis* в ході глибинного культивування. Даний препарат гідролізує складні протеїни рослинної сировини. До його складу входить комплекс нейтральних і лужних протеаз, а також β-глюканаза, α-амілаза, ксиліназа та целюлаза (табл. 2.2)

Таблиця 2.2

Склад ферментного препарату

Показники	Од/г
Нейтральна протеаза	120
<u>Глюканаза</u>	До 200
<u>Ксиланаза</u>	До 150
Бета-амілаза	До 300
Лужна протеаза	До 11000

Базальтові туфи (БТ) — це вулканічні гірські породи, утворені з ущільненого вулканічного попелу базальтового складу. Вони мають пористу структуру, високу площу поверхні, добру термічну стабільність і здатність до

сорбції. Унаслідок цього базальтові туфи можуть виступати ефективними носіями біологічно активних речовин, зокрема ферментів.

Слід зазначити, що до мінералогічного складу базальтових туфів родовища «Полицьке-ІІ», використаних у дослідженні, включає: цеоліти (35–40%), монтморилоніти (30–40%), польові шпати (10–15%), кремнезем (4–5%) та гематит (3–5%). Середньостатистичні результати аналізу хімічного складу туфу, виражені через масові відсотки оксидів, наведені в таблиці 2.3 [2].

Таблиця 2.3

Хімічний склад базальтових туфів родовища «Полицьке-ІІ»

SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅	SO ₃
67,44	1,75	12,82	10,14	0,09	5,02	0,46	0,94	1,06	0,12	0,11

На початку експерименту дослідних тварин *Carassius gibelio* було поділено на 4 дослідні групи:

Група (К) – тварини, які споживали корм без добавок (контрольна група);

Група (ІІ) – до корму додавали мультиензимний препарат «Протосубтилін Г3×А-120»;

Група (Т+ІІ) – тварини, яким до корму додавали іммобілізований на базальтовому туфі мультиензимний препарат «Протосубтилін Г3×А-120»;

Група (Т) – як кормову добавку використовували базальтовий туф без ферментного препарату.

Далі тварин по групах посадили в окремі 35 літрові ємності по 12 екземплярів в кожній. Попередньо проводили зважування кожної особини у всіх групах.

2.2. Методи досліджень

2.2.1. Приготування дослідного корму

При приготуванні перегранульованого корму з потрібною нам кормовою добавкою попередньо необхідно було підготувати стандартний гранульований корм «Aller Bronze».

Спочатку наважку зазначеного корму розмочували певний час у воді. Далі розмочений корм перетирали до однорідної консистенції. Після проведення даних маніпуляцій змішували отриману субстанцію з кормовою добавкою.

У групі **II** до корму додавали мультиензимний препарат «Протосубтилін Г3×А-120» у кількості 1 г/кг корму. У сільському господарстві рекомендована концентрація цього препарату складає 50 г/т корму. Ми підвищили дозу до 1 г/кг корму, оскільки вважаємо, що при потраплянні корму у водне середовище може відбуватися часткове вимивання ензиму.

У групі **T+II** для приготування корму з іммобілізованим ферментом попередньо проводили іммобілізацію ензимного препарату на базальтовому туфі. Для цього брали наважку попередньо подрібненого туфу в кількості, що становила 4% від сухої маси корму, та змішували її з ферментним препаратом у кількості 1 г/кг корму. Отриману суміш заливали фосфатним буфером з рН 7,4 і залишали в термостаті при температурі 30 °С на 1 годину для здійснення процесу іммобілізації.

У групі **T** у кормову суміш додавали попередньо подрібнений базальтовий туф з родовища «Полицьке-II» у кількості, що становила 4% від сухої маси корму.

Отримані суміші ретельно перемішували та формували гранули за допомогою шприца з обрізаним носиком, що дозволяло забезпечити однорідність діаметра кормових частинок. Сформовані гранули залишали для природного висихання при кімнатній температурі протягом 3–4 днів. Після повного висушування корм зберігали у герметичних пластикових контейнерах у холодильнику до подальшого використання.

2.2.2. Отримання дослідного матеріалу

На 1, 7, 14 та 21 доби експерименту відбирався дослідний матеріал.

Дослідних риб вилучали з ванночок та поміщали в окрему ємність із водою, до якої попередньо додавали анестезуючий препарат «Пропісцин» у концентрації 1 мл/л. Риб утримували в цьому розчині протягом 15 хвилин [20].

Після цього проводили препарування: за допомогою скальпеля з черевної порожнини вилучали кишечник, який переносили на чашку Петрі та поміщали у морозильну камеру ($t = -6\text{ }^{\circ}\text{C}$) для подальшого зберігання.

2.2.3. Визначення вмісту загального протеїну за методом Лоурі

Метод Лоурі ґрунтується на утворенні забарвлених продуктів синього кольору, що виникають унаслідок двох реакцій: біуретової реакції купрум-іонів з пептидними зв'язками в лужному середовищі та реакції відновлення фосфо-молібденових і фосфо-вольфрамових солей у реактиві Фоліна [25].

Необхідні реактиви:

Реактив А: 1 г NaOH + 5 г Na₂CO₃, доводили об'єм до 250 мл H₂O;

Реактив В: 0,5 г натрій цитрату + 0,25CuSO₄*5H₂O, доводили до 50 мл H₂O;

Реактив С: 50 мл реактиву А + 1 мл реактиву В (готується безпосередньо перед використанням);

Реактив Е: розведений реактив Фоліна у співвідношенні 1:1 з H₂O.

Порядок проведення аналізу:

До 0,1 мл дослідного розчину додавали 0,9 мл H₂O, потім 2 мл реактиву С, перемішували та витримували 10 хв. Потім додавали 0,2 мл реактиву Е та ставили на 30 хв в темряву. Для контролю брали 1 мл H₂O і додавали 2 мл реактиву С.

Колориметрування здійснювали при довжині хвилі $\lambda = 750\text{ нм}$ у кюветах з товщиною світлошару 0,5 мм. Кількісний вміст білка розраховували за калібрувальною кривою, побудованою за стандартними розчинами білка.

2.2.4. Визначення рівня протеолітичної активності модифікованим методом Ансона

Загальну протеолітичну активність у трьох рН-діапазонах (4,8; 7,4; 9,0) визначали за модифікованим методом Ансона із використанням двох різних білкових субстратів: казеїну — для визначення активності нейтральних та лужних протеїназ, та гемоглобіну — для оцінки активності кислих протеїназ.

Метод ґрунтується на гідролізі білкових субстратів до пептидів та амінокислот із подальшим кількісним визначенням утворених продуктів реакції. За одиницю протеолітичної активності приймали кількість ферменту, яка за 1 хв при температурі 30 °С переводить казеїн у неосаджуваний трихлороцтовою кислотою стан, що еквівалентно утворенню 1 мкмоль тирозину.

Для приготування універсального буферу змішували у рівних частинах три 0,1 М розчини: оцтової кислоти (розчин А), ортофосфатної кислоти (розчин В) і борної кислоти (розчин С). Отриманий розчин мав рН $\approx 1,8$. Для доведення до потрібних значень рН (4,8; 7,4; 9,0) до отриманого розчину додавали розчину NaOH концентрацією 1 моль/дм³.

Приготування субстратів:

Казеїновий субстрат (для рН 7,4/9,0): до 90 мл буферного розчину додавали 2 г сухого натрієвого казеїнату, розчиняли на водяній бані при 60–70 °С, охолоджували, доводили об'єм до 100 мл тим же буфером.

Гемоглобіновий субстрат (для рН 4,8): до 0,6 мл каліброваного розчину гемоглобіну (концентрація 150 г/л) додавали 8,4 мл буферу та 0,54 мл 6% сечовини. Суміш інкубували 1 год при кімнатній температурі.

Хід визначення протеолітичної активності:

Дослідна проба: до 0,125 мл субстрату додавали 0,25 мл гомогенату, інкубували при 30 °С протягом 30 хв. Після цього додавали 0,5 мл 5% розчину трихлороцтової кислоти для зупинки реакції та осадження білка.

Контрольна проба: компоненти змішували у тому ж порядку, але розчин ТХО додавали до початку інкубації.

Після інкубування проби центрифугували 15 хв при 15 000 g. Далі, до 0,5 мл надосадового розчину додавали 2,5 мл 0,5 М розчину Na₂CO₃ та 0,5 мл розведеного реактиву Фоліна. Суміш перемішували та інкубували в темряві 30 хв.

Холості проби готували за аналогічною схемою, однак замість надосадку додавали 0,5 мл буферного розчину відповідного рН.

Колориметрування дослідних і контрольних проб здійснювали проти холостої проби за довжини хвилі 670 нм в кюветах з товщиною поглинаючого світлошару 10 мм.

Розрахунок проводили за наступною формулою: «

$$PA = \frac{D * 0,1 * V \text{ із тхо}}{0,25 * V_{\text{дос}} * 30 * \text{мг} \frac{\text{білку}}{\text{мл}}}$$

D – величина оптичної щільності, D_{дос.} – D_{кон.};

0,1 – концентрація стандартного розчину тирозину;

V_{із тхо} – 0,875 мл;

V_{дос} – об'єм гомогенату, 0,25 мл;

30 – час інкубації при 30 С, хв;

0, 25 – коефіцієнт екстинкції стандартного розчину» [9].

2.2.5. Визначення амілолітичної активності методом Каравея

Амілаза каталізує гідроліз полісахариду крохмалю до декстринів і мальтози — продуктів, які не утворюють забарвлених комплексів із йодом. Визначення активності ферменту ґрунтується на зменшенні оптичної густини субстратно-буферного розчину після ферментативного гідролізу крохмалю [12].

Для проведення аналізу у пробірки як з дослідними, так і з контрольними пробами вносили по 0,5 мл субстратно-буферного розчину (співвідношення 1:24). Далі здійснювали інкубування протягом 5 хвилин у водяному термостаті при температурі 37 °С. Всі наступні компоненти додавали безпосередньо в термостаті.

Дослідна проба: до пробірки додавали 0,01 мл гомогенату та інкубували 7,5 хв при 37 °С.

Контрольна проба: на цьому етапі гомогенат не додавали, інкубування продовжували ще 7,5 хв при 37 °С.

Після завершення інкубування до обох проб додавали 0,5 мл розчину йоду та 4 мл дистильованої води. Лише тоді до контрольної проби вносили 0,01 мл гомогенату.

Як дослідні, так і контрольні проби колориметрували за допомогою фотоелектроколориметра за довжини хвилі 670 нм в кюветах з товщиною поглинаючого світлошару 10 мм проти дистильованої води.

Розрахунок проводили за формулою: «

$$A \text{ Амiлази (дiастази), } \frac{\text{г}}{\text{год} \cdot \text{л}} = \frac{E_{\text{холост}} - E_{\text{дослiд}}}{E_{\text{холост}}} * 160,0, \text{ де}$$

160,0 – коефіцієнт перерахунку на кількість крохмалю в грамах, гідролізованого в аналізованій рідині в 1 л за 1 год інкубації;

$E_{\text{дослiд}}$ – оптична густина дослідної проби, од. екстинції;

$E_{\text{холост}}$ – оптична густина холостої проби, од. екстинції» [12].

2.2.6. Уніфікований метод визначення активності ліпази

Ліпаза — це гідролітичний фермент, що каталізує розщеплення тригліцеридів до гліцерину та вільних жирних кислот. Активність ліпази визначають колориметричним методом, що базується на зміні оптичної густини реакційної суміші в ультрафіолетовому діапазоні внаслідок ферментативного гідролізу тригліцеридів [4].

Першочергово всі реактиви доводили до робочої температури, а саме 37 °С. У пробірки вносили по 3 мл робочого розчину оливкової олії. Після цього в дослідну пробу додавали 0,1 мл досліджуваного гомогенату та інкубували суміш у водяному термостаті при 37 °С протягом 2 хвилин.

Після інкубації вимірювали оптичну густина розчину на спектрофотометрі в кюветах із товщиною світлопоглинаючого шару 10 мм при довжині хвилі 340 нм, використовуючи дистильовану воду як контроль.

Після першого вимірювання пробірку повертали у термостат ще на 5 хвилин, після чого повторно вимірювали оптичну густину за тих самих умов. Різниця між показниками поглинання до та після повторного інкубування використовувалась для розрахунку активності ліпази. «

$$ЛА \left(\frac{\text{мкмоль}}{\text{хв} * \text{л}} \right) = \frac{\Delta E * 170 * 3 * 1000}{E_k * 1000 * 0.1}, \text{де}$$

ΔE - зміна екстинкції дослідної проби за 1 хв;

170 - концентрація маслинової олії в робочій емульсії (мкмоль/л), за якої екстинкція дорівнює приблизно 1;

E_k - екстинкція робочої емульсії маслинової олії (170 мкмоль/л);

3/1 000 - об'єм робочої емульсії маслинової олії у літрах;

1000/0,1 - коефіцієнт перерахунку на 1 л» [4].

2.2.7. Статистична обробка експериментальних даних

Для статистичної обробки отриманих результатів було використано метод дисперсійного аналізу (ANOVA), який дозволяє оцінити наявність статистично значущих відмінностей між середніми значеннями кількох груп [28].

Статистичну обробку даних було проведено із застосуванням критичного рівня значущості $p \leq 0.05$.

За наявності статистично значущих відмінностей додатково застосовували критерій Tukey's HSD для виявлення парних відмінностей між групами [30].

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У ході дослідження використовували комплексний ферментний препарат «», що володіє протеолітичною активністю нейтральних і лужних протеаз, та активністю супутніх ферментів, зокрема з амілолітичною активністю. У тваринництві та рибництві цей препарат є перспективною кормовою добавкою, що сприяє покращенню засвоєнню білкових компонентів, особливо за умов часткової або повної заміни рибного борошна рослинними інгредієнтами.

Однак, подібно до інших ферментних препаратів, вільна форма Протосубтиліну схильна до втрати активності за дії несприятливих факторів, зокрема кислого середовища шлунку риб (рН 4–5) або високих температур під час технологічної обробки кормів.

Відповідно, іммобілізація Протосубтиліну на базальтових туфах розглядається як ефективний підхід для підвищення його стабільності й забезпечення пролонгованої дії в умовах аквакультури. Базальтовий туф, завдяки своїй пористій цеолітній структурі, володіє високою адсорбційною здатністю, що дозволяє використовувати його як матрицю при іммобілізації ферментних препаратів. Адсорбційне закріплення Протосубтиліну на частинках туфу дозволило б створити стабільну форму ензиму, яка здатна діяти в ширшому діапазоні рН та забезпечує поступове вивільнення активних ферментів у шлунково-кишковому тракті риб.

Враховуючи те, що основна гідролітична активність Протосубтиліну припадає на лужні та нейтральні протеази очікується, що його додавання до гранульованого корму сприятиме підвищенню активності травних ферментів риб і, відповідно, інтенсивнішому приросту маси.

Отже, в ході здійснення експерименту дослідних тварин було поділено на 4 групи (зазначені у розділі II), яких протягом 3 тижнів годували перегранульованими кормами з функціональними добавками. На 7, 14 та 21 дні експерименту у риб відбирали проби кишківника з метою визначення рівня

активності травних ферментів в них, зокрема кислих, лужних, нейтральних протеаз, а також амілази та ліпази.

На рис. 3.1 показані результати визначення протеолітичної активності в нейтральному діапазоні рН у дослідних груп риб на 0, 7, 14 та 21 дні вигодовування.

Встановлено, що протягом усього експерименту вищий рівень протеолітичної активності спостерігався в групах риб, що отримували корм з додаванням ферментного препарату. При цьому, найвищі показники активності, як і очікувалося, були у групи, яку вигодовували кормом з іммобілізованим Протосубтиліном. Різниця в рівнях активності між цією групою та контрольною була значною: на 7-й день — близько 57%, на 14-й день — 39%, на 21-й день — 29,5%.

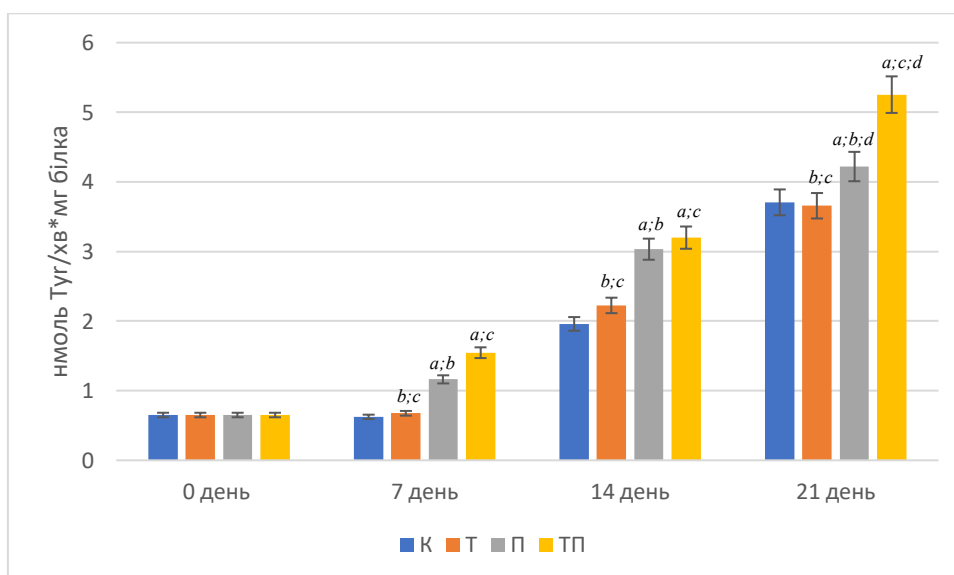


Рис. 3.1. Загальна протеолітична активність (рН 7,4) гомогенату кишечника *Carassius gibelio* за умов вигодовування кормом з додаванням різних типів кормових добавок, нмоль Туг/хв *мг білку

Примітка: *a* - достовірна різниця відносно контрольної групи (К); *b* - достовірна різниця між групами Т та П; *c* – достовірна різниця між групами Т та ТП; *d* – достовірна різниця між групами П та ТП, ($p \leq 0.05$)

Підвищення нейтральної протеазної активності в групах з ферментами, ймовірно, зумовлене декількома взаємопов'язаними факторами. Зокрема, екзогенна протеаза могла доповнювати дію ендогенних ферментів риби.

Протеази Протосубтиліну могли гідролізувати частину харчового білка до пептидів ще до того, як це зроблять власні ферменти риби. Крім того, активніший білковий гідроліз міг стимулювати травну систему риби, оскільки пептиди та амінокислоти можуть впливати на секрецію травних ферментів [23].

Вищі показники протеолітичної активності в нейтральному діапазоні рН у групи з іммобілізованим ферментом можуть бути зумовлені більшою стабільністю ферменту, що дозволило йому довше зберігати активність. Це, в свою чергу, сприяло більш вираженій кумулятивній дії. Частинки туфу, ймовірно, уповільнювали пасаж ферменту через кишківник або захищали його від протеолізу та денатурації, що дозволило більшій кількості субстрату бути гідролізованим. Прикладом такого ефекту є мікрокапсулювання ферментів: альгінатно-бентонітові мікрокапсули з екзогенними протеазами для тилапії забезпечили ~27% підвищення ферментативної активності у кишечнику риб порівняно з контрольною дієтою [34]. У нашому випадку базальтовий туф виконував роль носія, подібного до бентоніту, тому група з іммобілізованим Протосубтиліном і показала найвищий рівень нейтральних протеаз.

Водночас у групі, що отримувала тільки базальтовий туф, не спостерігалось значних змін активності протеаз у порівнянні з контрольною групою.

Характерною особливістю карася сріблястого є те, що він відноситься до безшлункових видів риб. У зв'язку з цим, процес травлення білків у даного виду майже повністю залежить від панкреатичних ферментів (зокрема трипсину та хімотрипсину) та протеїназ кишківника, таких як дипептидази (гліцилгліциндипептидаза, гліциллейциндипептидаза, проліназа), амінопептидази (аланін-амінопептидаза), а також ентерокиназа.

На рисунку 3.2 представлені результати визначення рівня активності лужних протеїназ кишківника *Carassius gibelio*.

Згідно з результатами можна стверджувати, що динаміка активностей лужних та нейтральних протеїназ у дослідних групах є майже ідентичною.

Протягом експерименту групи ТП та П демонстрували досить високий рівень активності лужних протеїназ, група П, тоді як група Т не відрізнялася від контролю. Порівнюючи протеолітичну активність лужних протеаз між групами ТП та К, ми спостерігаємо різницю на 7-й день — 65,5%, на 14-й день — 33,5%, на 21-й день — 43,6%

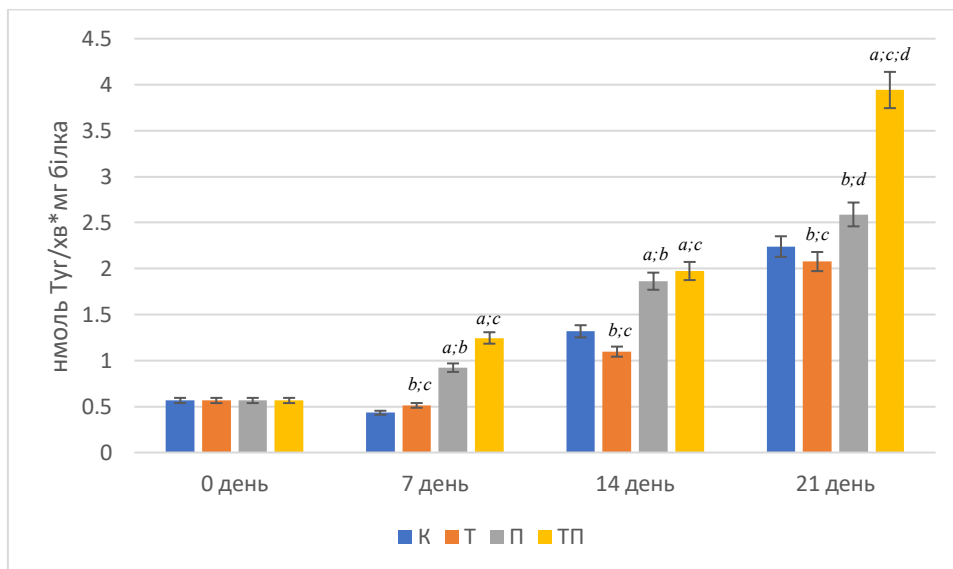


Рис. 3.2. Загальна протеолітична активність (рН 9,0) гомогенату кишечника *Carassius gibelio* за умов вигодовування кормом з додаванням різних типів кормових добавок, нмоль Туг/хв *мг білку

примітка: a - достовірна різниця відносно контрольної групи (К); b - достовірна різниця між групами Т та П; c – достовірна різниця між групами Т та ТП; d – достовірна різниця між групами П та ТП, ($p \leq 0.05$)

Отримані результати можна вважати прогнозованими, оскільки Протосубтилін, який використовувався як кормова добавка, характеризується високою активністю лужних протеаз - до 11000 од/г.

Ймовірно, що екзогенна протеаза, активна при рН \approx 8–9, підсилила активність ендогенного трипсину в кишечнику риб. Це дозволило частині білків корму гідролізуватися бактеріальними ферментами ще до того, як це зробили власні травні ферменти, аналогічно до нейтральних протеаз. Такий підхід особливо ефективний для сріблястого карася, оскільки у нього відсутня стадія шлункового перетравлення, і все навантаження лягає на кишечник.

Відповідно можна стверджувати, що давання протеази компенсувало низькі рівні власних ферментів і покращило гідроліз білка.

Крім прямого внеску до гідролізу, екзогенна протеаза може впливати на секрецію ендогенних ферментів через зміни вмісту кишечника. Відомо, що високі концентрації пептидів можуть через гормональні механізми або вплив на кишкові хеморецептори регулювати інтенсивність виділення певних ендогенних ферментів. Наприклад, дослідження на білому амурі показали, що внесена до корму екзогенна целюлаза не лише розщеплювала клітковину, а й стимулювала підвищення активності ендогенних протеаз і амілаз [40]. Аналогічно й у нашому випадку додатковий протеолітичний ефект міг призвести до посиленого виділення трипсину підшлунковою залозою в групах П і ТП.

Щодо корму з іммобілізованим ферментним препаратом, то, як і у випадку з протеолітичною активністю нейтральних протеаз, в цій групі спостерігалися найвищі показники активності протягом усього експерименту. Це, ймовірно, пов'язано з тим, що частинки туфу рівномірніше доставляли фермент по всьому кишечнику, забезпечуючи його пролонговану дію. Такий підхід відрізняється від простого додавання порошкового ферменту, який може частково інактивуватися або діяти протягом коротшого часу. Це підтверджується спостереженнями на 21-й день експерименту, коли різниця в активностях між групами ТП і П склала 33,6%.

Сріблястий карась, як представник корошових, не має справжнього шлунка і, відповідно, у травному тракті даного виду риб кисле середовище виражене слабо (рН переднього відділу кишечника є слабокислим ~6,4) [11]. Внаслідок цього базальна активність кислих протеаз у кишечнику карася є низькою.

За результатами наших досліджень, від самого початку експерименту спостерігалася висока активність кислих протеаз у групі ТП порівняно з іншими групами (рис. 3.3.). Протягом перших двох тижнів різниця в активності між групою ТП та контрольною групою становила 72% і 64%

відповідно. Однак, варто зазначити, що протягом цих двох тижнів не спостерігалось значних змін в активності кислих протеаз у жодній з груп.

Натомість на 21-й день експерименту ми відзначили істотне підвищення рівня активності протеаз у кожній з груп. Найвища активність зберігалася в групі ТП, але в той же час активність решти груп зросла майже вдвічі. Найнижчі показники активності кислих ферментів спостерігалися в групі Т як на 14-й, так і на 21-й день експерименту.

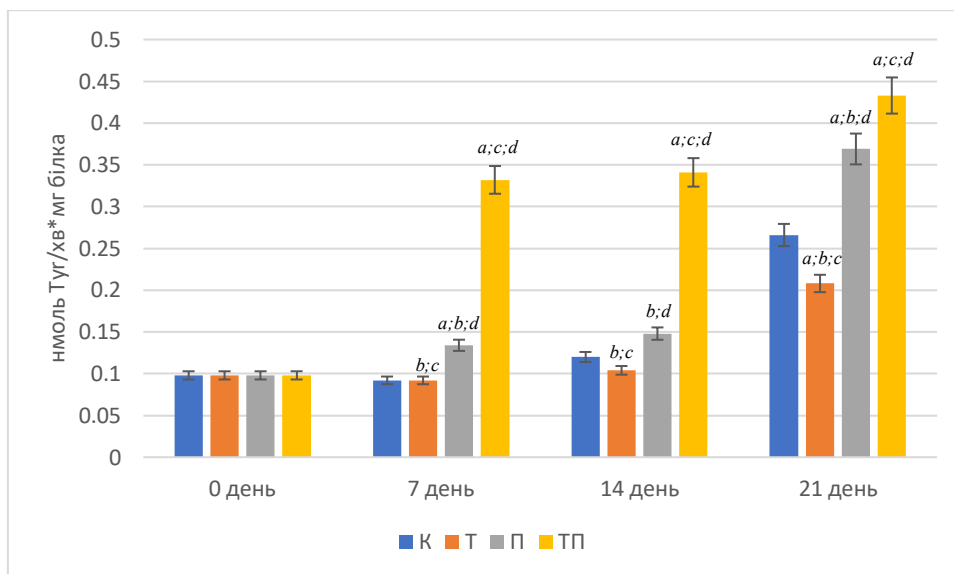


Рис. 3.3. Загальна протеолітична активність (рН 4,8) гомогенату кишечника *Carassius gibelio* за умов вигодовування кормом з додаванням різних типів кормових добавок, нмоль Туг/хв *мг білку

примітка: a - достовірна різниця відносно контрольної групи (К); b - достовірна різниця між групами Т та П; c – достовірна різниця між групами Т та ТП; d – достовірна різниця між групами П та ТП, ($p \leq 0.05$)

Найвищі ж показники активності кислих протеаз у групі, в якій риб вигодовували кормом з іммобілізованим ферментним препаратом, можна пояснити наступним чином: іммобілізація ферментного препарату Протосубтилін на частинках базальтового туфу могла підвищити його стабільність при відхиленні рН від оптимального. В ході аналізу літератури було знайдено інформацію, що іммобілізований на твердому носії бактеріальний протеазний препарат зберігає значну частку активності при кислому рН, тоді як вільний фермент швидко інактивується. Наприклад, при

pH 5,0 вільний протосубтилін утрачав близько 80% активності, тоді як іммобілізований зберігав ~42% активності навіть при pH 4 [3]. Це свідчить, що іммобілізація здатна розширити pH-профіль дії ферменту в кислу зону за рахунок захисту ферментних молекул.

У нашому дослідженні діапазон pH у кишечнику карася не є настільки кислим, але ця властивість могла запобігти навіть частковій інактивації ферменту в передньому відділі кишківника, де pH (~6,4) дещо нижчий за оптимальне значення для протеази.

Порівнюючи протеолітичні активності в трьох досліджуваних діапазонах pH, слід відзначити, що найвища активність припадає саме на нейтральні протеази.

Carassius gibelio — всеїдна риба, однак в її раціоні все ж переважають корми рослинного походження, тому наявність активної амілази в їх кишечнику є життєво необхідною. Основним амілолітичним ферментом у риб є панкреатична α -амілаза, яка активна при нейтральному або слабо лужному pH. Враховуючи це, ми поставили перед собою завдання визначити активність α -амілази в кишечнику досліджуваних риб на 7, 14 та 21 дні вигодовування (рис. 3.4.).

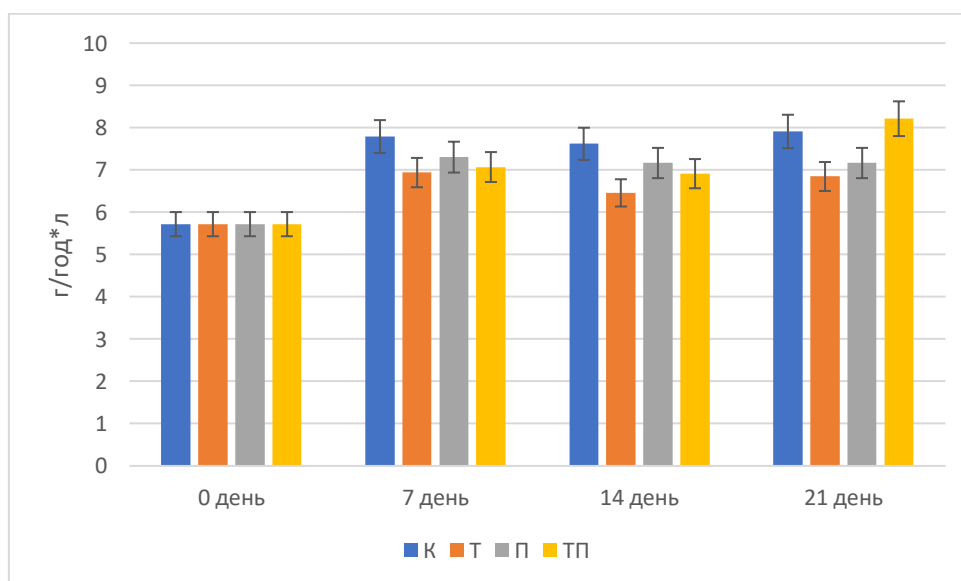


Рис. 3.4. Амілолітична активність гомогенату кишечника *Carassius gibelio* за умов вигодовування кормом з додаванням різних типів кормових добавок, г/год*л

примітка: *a* - достовірна різниця відносно контрольної групи (*K*); *b* - достовірна різниця між групами *T* та *II*; *c* – достовірна різниця між групами *T* та *III*; *d* – достовірна різниця між групами *II* та *III*, ($p \leq 0.05$)

За результатами визначення активності амілази у дослідних риб можна стверджувати, що в контрольній групі амілолітична активність протягом 21 дня залишалася незмінною. Це типовий випадок адаптації до дієти: за стабільного раціону підшлункова залоза риб підтримує сталий рівень амілази, іноді збільшуючи її активність у міру збільшення кількості спожитого корму. Подібну ситуацію спостерігали і в групах *T* та *II*. Протягом усього експерименту амілолітична активність в цих групах залишалася стабільною без істотних змін.

Необхідно зазначити, що хоча амілаза також притаманна ферментному препарату, який ми використовували в дослідженні, достовірної різниці в амілолітичній активності кишечника між групами з вільним та іммобілізованим Протосубтиліном, у порівнянні з контрольною групою, зафіксовано не було.

Що стосується ліпази, то визначення її активності в кишечнику риб було здійснено з метою оцінити опосередкований вплив екзогенних протеаз на гідроліз жирів. Незважаючи на те, що «Протосубтилін Г3×А-120» не містить специфічних ліполітичних ферментів у своєму складі, численні дослідження свідчать, що покращення білкового травлення може впливати на загальну ефективність травної системи, зокрема і на перетравлення жирів. У контексті аквакультури це особливо важливо, оскільки жири є головним джерелом енергії для більшості видів риб, а ефективність їх засвоєння безпосередньо впливає на темпи росту та конверсію корму.

Отже, на рисунку 3.5 зображені результати визначення рівня активності ліпази у кишечниках дослідних груп *Carassius gibelio*.

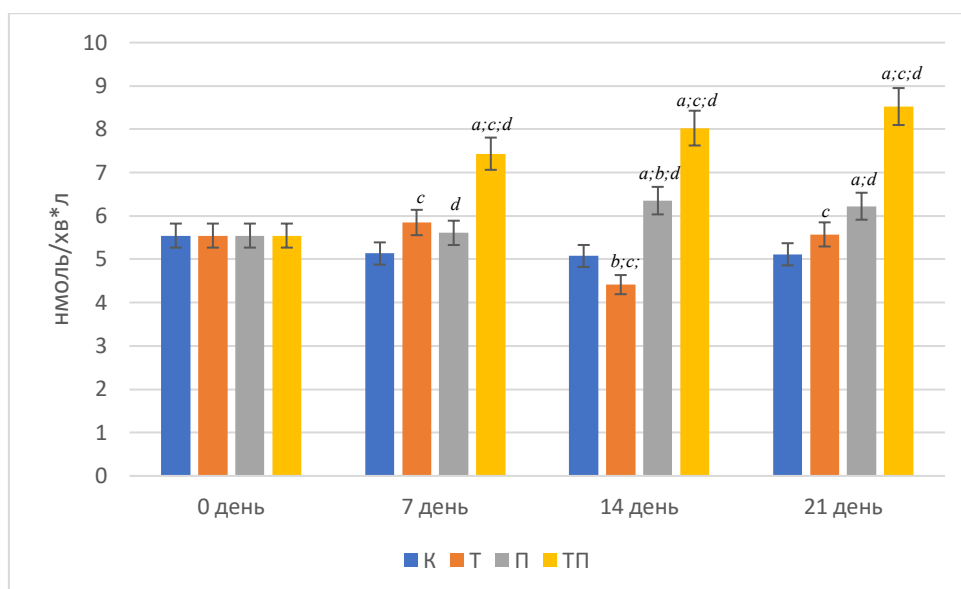


Рис. 3.5. Ліполітична активність гомогенату кишечника *Carassius gibelio* за умов вигодовування кормом з додаванням різних типів кормових добавок, нмоль/хв*л

примітка: *a* - достовірна різниця відносно контрольної групи (К); *b* - достовірна різниця між групами Т та П; *c* – достовірна різниця між групами Т та ТП; *d* – достовірна різниця між групами П та ТП, ($p \leq 0.05$)

Встановлено, що найвищі показники ліпазної активності протягом усього експерименту спостерігалися в групі ТП. У контрольній групі активність ліпази залишалася стабільною без значних коливань. Різниця в активності між групами, які отримували корм з додаванням іммобілізованого Протосубтиліну, та контрольною групою становила: на 7-й день — 31%, на 14-й день — 37%, на 21-й день — 40%.

У групі з вільним ферментом спостерігалася незначна тенденція до зростання ліпазної активності. На 7-й день різниця між групами П та контрольною була незначною, однак до 14-го дня ліполітична активність у цій групі збільшилася на 12%. Далі ліпазна активність у групі П залишалася стабільною і не змінювалася до 21-го дня експерименту.

Отримані значення можуть бути пояснені тим, що покращення гідролізу білків та вуглеводів у групах П і ТП могло опосередковано підвищити ефективність травлення жирів. Це пов'язано з тим, що краще засвоєння інших нутрієнтів часто корелює з вищою активністю ліпази, оскільки організм,

умовно, налаштовується на інтенсивний ріст і потребує більше енергії з жирів. Риби, які отримують більше легкозасвоюваного білка, можуть споживати більше корму, що стимулює секрецію більшої кількості травних ферментів, зокрема ліпаз.

Дослідження показують, що додавання екзогенних ферментів, таких як протеази, може покращити перетравлення білків і вуглеводів, що в свою чергу може впливати на активність ліпази. Наприклад, дослідження на *Culter mongolicus* виявило, що збільшення рівня білка в раціоні до певного оптимального рівня призводить до підвищення активності трипсину та ліпази, що свідчить про взаємозв'язок між засвоєнням білка та активністю ліпази [33].

В свою чергу, найвищі показники активності протягом усього експерименту в групі з іммобілізованим Протосубтиліном можуть бути зумовлені більшою стабільністю ферменту, що дозволило йому довше зберігати активність, сприяючи його більш вираженій кумулятивній дії.

ВИСНОВКИ

1. Вигодовування дослідних риб кормом із додаванням іммобілізованої форми ферментного препарату «» забезпечує максимальний рівень активності нейтральних та лужних протеїназ кишечника на 21-ий день експерименту. Загальна протеолітична активність в кислому діапазоні рН підвищена у порівнянні зі всіма дослідними групами протягом всього експерименту.

2. Застосування досліджуваних кормових добавок не призвело до змін рівня амілолітичної активності кишечника карася сріблястого протягом усього періоду вигодовування.

3. Найвищу ліпазну активність зафіксовано в групі, що отримувала як кормову добавку іммобілізований ферментний препарат, із перевищенням показників контрольної групи на 31 % на 7-й день, 37 % — на 14-й і 40 % — на 21-й день.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Біохімія ензимів : підручник / М.М. Марченко, Л.В. Худа, М.М. Великий, Л.І. Остапченко. – Чернівці: Чернівецький нац. ун-т, 2012 – 416 с.
2. Кобаса І. М. Природний мінерал базальтовий туф : склад, властивості та використання : монографія / І. М. Кобаса, В. В. Цимбалюк. – Чернівці : Чернівецький нац. ун-т, 2015. – 264 с. ISBN 978-966-423-321-4
3. Селезньова О. О., Цехмістренко С. І., Поліщук, В. М., Поліщук, С. А. Стабілізація ферментного препарату протосубтилін ГЗХ з метою використання його в птахівництві. Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва: зб. наук. праць. Біла Церква: БНАУ. 2018. №2 (145). С. 54–62.
4. Склярів О. Біохімія ензимів. Ензимодіагностика. Ензимопатологія. Ензимотерапія / О. Склярів, Я. Сольські, М. Великий, Н. Фартушок, Т. Бондарчук, Д. Дума. – Львів: Кварт. – 2008. – 218 с.
5. Adamczak B., Wieczór M., Kogut M., Stangret J., Czuby J. Molecular basis of the osmolyte effect on protein stability: lesson from the mechanical unfolding of lysozyme. // *Biochemical Journal*. 2016. Vol. 473, № 20. P. 3705–3724
6. Adeoye A. A., Jaramillo-Torres A., Fox S. W., Merrifield D. L., Davies S. J. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. *Animal Feed Science and Technology*. 2016. Vol. 215. P. 133-143.
7. Ahmed, S. A., Abdel Wahab, W. A., & Abdel-Hameed, S. A. M. (2019). Comparative study in kinetics and thermodynamic characteristics of immobilized caseinase on novel support from basalt by physical adsorption and covalent binding. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101028.
8. ali Zamini, A., Kanani, H.G., azam Esmaeili, A. *et al.* Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). *Comp Clin Pathol* 23, 187–192 (2014).

9. Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, 22(1), 79–89.
10. Bilal, M., Qamar, S. A., Carballares, D., Berenguer-Murcia, Á., & Fernandez-Lafuente, R. (2023). Proteases immobilized on nanomaterials for biocatalytic, environmental and biomedical applications: Advantages and drawbacks. *Biotechnology Advances*, 108304.
11. Bitterlich, G. (1985). Digestive enzyme pattern of two stomachless filter feeders, silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and bighead carp, *Aristichthys nobilis* Rich. *Journal of Fish Biology*, 27(2), 103–112.
12. Caraway, W. T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *American Journal of Clinical Pathology*. 1959. Vol. 32. P. 97-99.
13. Chen, S., Maulu, S., Wang, J., Xie, X., Liang, X., Wang, H., Wang, J., & Xue, M. (2024). The application of protease in aquaculture: Prospects for enhancing the aquafeed industry. *Animal Nutrition*, 16, 105-121.
14. Dalsgaard J, Verlhac V, Hjermitsev NH, Ekmann KS, Fischer M, Klausen M, Pedersen PB (2012) Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. *Anim Feed Sci Technol* 171:181–191
15. Ghomi MR, Shahriari R, Langroudi HF, Nikoo M, von Elert E. Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. *Aquac Int*. 2012;20:249–254.
16. Hassaan, M. S., El-Sayed, A. I. M., Soltan, M. A., Iraqi, M. M., Goda, A. M., Davies, S. J., El-Haroun, E. R., & Ramadan, H. A. (2019). Partial dietary fish meal replacement with cotton seed meal and supplementation with exogenous protease alters growth, feed performance, hematological indices and associated gene expression markers (GH, IGF-I) for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 503, 282–292.

17. *Ideal attractant in aquatic products: Betaine - Polifar.* (б. д.). Feed Additives And Food Additives Supplier- Polifar. <https://www.polifar.com/Ideal-attractant-in-aquatic-products-Betaine-id42132837.html>
18. Ismail, T., Hegazi, E., Dawood, M. A. O., Nassef, E., Bakr, A., Paray, B. A., & Van Doan, H. (2020). Using of betaine to replace fish meal with soybean or/and corn gluten meal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets: Histomorphology, growth, fatty acid, and glucose-related gene expression traits. *Aquaculture Reports*, 17, 100376.
19. Kalhoro, Hameeda, et al. Soy protein concentrate as a substitute for fish meal in diets for juvenile *Acanthopagrus schlegelii*: effects on growth, phosphorus discharge and digestive enzyme activity. *Aquaculture research*. 2018. Vol. 49.5. P. 1896-1906.
20. Kazuń K., Siwicki A. K. Propiscin—a safe new anaesthetic for fish. *Fisheries & Aquatic Life*. 2012. Vol. 20(3). P. 173-177.
21. Khalil, M., Azmat, H., Khan, N., Javid, A., Hussain, A., Hussain, S. M., Ullah, A., & Abbas, S. (2018). Growth Responses of Striped Catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) to Exogenous Enzyme Added Feed. *Pakistan Journal of Zoology*, 50(2).
22. Kumar, S., Sahu, N.P., Pal, A.K. *et al.* Studies on digestibility and digestive enzyme activities in *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles: effect of microbial α -amylase supplementation in non-gelatinized or gelatinized corn-based diet at two protein levels. *Fish Physiol Biochem* 32, 209–220 (2006).
23. Liang, Q., Yuan, M., Xu, L. *et al.* Application of enzymes as a feed additive in aquaculture. *Mar Life Sci Technol* 4, 208–221 (2022).
24. Liu, S., Feng, L., Jiang, W.-D., Liu, Y., Jiang, J., Wu, P., Zeng, Y.-Y., Xu, S.-D., Kuang, S.-Y., Tang, L., Tang, W.-N., Zhang, Y.-A., & Zhou, X.-Q. (2016). Impact of exogenous lipase supplementation on growth, intestinal function, mucosal immune and physical barrier, and related signaling molecules mRNA expression of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*, 55, 88–105.

25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
26. Maas, R.M., Deng, Y., Dersjant-Li, Y. *et al.* Exogenous enzymes and probiotics alter digestion kinetics, volatile fatty acid content and microbial interactions in the gut of Nile tilapia. *Sci Rep* 11, 8221 (2021).
27. Maas, Roel M., et al. The effect of phytase, xylanase and their combination on growth performance and nutrient utilization in Nile tilapia. *Aquaculture*. 2018. Vol. 487. P. 7-14.
28. Milosan, I. (2016). Statistical processing of experimental data using analysis of variance. *Scientific research and education in the air force*, 18(1), 489–496.
29. Mohammed A. Effect of Multi-Enzyme Supplementation on Growth Performance of Rabbits. *Asia Pacific Journal of Sustainable Agriculture*. 2023. Food and Energy. Vol. 11(1) P. 11-15.
30. Multiple comparison test by Tukey's honestly significant difference (HSD): Do the confident level control type I error / A. Nanda et al. *International Journal of Statistics and Applied Mathematics*. 2021. Vol. 6, no. 1. P. 59–65.
31. Onomu, A. J., & Okuthe, G. E. (2024). The Role of Functional Feed Additives in Enhancing Aquaculture Sustainability. *Fishes*, 9(5), 167.
32. Pötzl, C., Siegesmund, S., López-Doncel, R. *et al.* Key parameters of volcanic tuffs used as building stone: a statistical approach. *Environ Earth Sci* 81, 10 (2022).
33. Qian, J., Xiao, L., Feng, K., Li, W., Liao, C., Zhang, T., & Liu, J. (2022). Effect of dietary protein levels on the growth, enzyme activity, and immunological status of *Culter mongolicus* fingerlings. *PLOS ONE*, 17(2), Стаття e0263507.
34. Rodriguez, Y. E., Laitano, M. V., Pereira, N. A., López-Zavala, A. A., Haran, N. S., & Fernández-Gimenez, A. V. (2018). Exogenous enzymes in

aquaculture: Alginate and alginate-bentonite microcapsules for the intestinal delivery of shrimp proteases to Nile tilapia. *Aquaculture*, 490, 35–43.

35. Siddik, M. A. B., Howieson, J., Fotedar, R., & Partridge, G. J. (2021). Enzymatic fish protein hydrolysates in finfish aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 406–430.

36. Tarkan A. S., Gaygusuz Ö., Gürsoy Gaygusuz Ç., Sac G., & Copp G. H. Circumstantial evidence of gibel carp, *Carassius gibelio*, reproductive competition exerted on native fish species in a mesotrophic reservoir. *Fisheries Management and Ecology*. 2012. Vol. 19(2). P. 167-177.

37. Trach, Y., Tytkowska-Owerko, M., Reczek, L., & Michel, M. (2021). Comparison the Adsorption Capacity of Ukrainian Tuff and Basalt with Zeolite–Manganese Removal from Water Solution. *Journal of Ecological Engineering*, 22(3), 161–168.

38. Weil, C., Lefèvre, F. & Bugeon, J. Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. *Rev Fish Biol Fisheries* 23, 157–173 (2013).

39. Yadav, N.K., Sharma, S.K. & Meena, D.K. Exogenous papain supplementation: impacts on growth, digestibility, digestive enzyme activities and oxidative stress in *Labeo rohita* fingerlings. *Aquac. Sci. Manag.* 1, 1 (2024).

40. Zhou, Y., Yuan, X., Liang, X.-F., Fang, L., Li, J., Guo, X., Bai, X., & He, S. (2013). Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: The effect of exogenous cellulase. *Aquaculture*, 416-417, 17

ДОДАТКИ

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 сер едовищ.

Кожен працівник в лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце. Перед початком роботи слід одягти спецодяг (халат).

В спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторії.

При можливості скляний посуд і скляні частини заміняють 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:

- всю 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 і ін.) дотримуються такої вимоги:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при включеній 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 і з закінченим терміном зберігання;

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

Категорично забороняється працювати в лабораторії одному.

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

Надання першої допомоги

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно виключити 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 змазати 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.