На правах рукописи

КАШИНОВА ЭЛЬТА БАСАНГОВНА

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ КОРМОВОЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ ИЗ ЭНДОКРИННО-ФЕРМЕНТНОГО СЫРЬЯ

05.18.04 «Технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание степени

кандидата технических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в Экспериментальной клинике-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова» (ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»

Научный руководитель: кандидат технических наук
Федулова Лилия Вячеславовна
Заведующий Экспериментальной клиникой-лабораторией биологически активных веществ животного происхождения
ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова»

Официальные оппоненты: **Гиро Татьяна Михайловна**
доктор технических наук, профессор кафедры «Технология производства и переработки продукции животноводства»,
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова»

Винокур Михаил Леонидович
кандидат технических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник лаборатории химико-технологических исследований,
ФГБНУ «Атлантический научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», г. Ставрополь

Защита диссертации состоится «29» сентября 2017 г. в 11-00 ч. на заседании Диссертационного совета Д 307.004.03 при ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО») по адресу: 107140, г. Москва, ул. В. Красносельская, 17. Факс: (499) 264-91-87, e-mail: fishing@vniro.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «ВНИРО» и на сайте: http://vniro.ru/

Автореферат разослан «15» августа 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Татарников Вячеслав Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. За последние годы в России значительно вырос объём перерабатываемой продукции свиноводства, что соответствует утвержденной Государственной программе импортозамещения на 2014-2015 гг. По состоянию на 1 апреля 2015 года переработано 20 738 тыс. гол. свиней и получено 708,3 тыс. тонн продуктов убоя. Однако ежегодное увеличение поголовья свиней на всей территории России влечёт за собой рост заболеваемости, в особенности, молодняка свиней, заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Повсеместно для сохранения поголовья и лечения заболеваний ЖКТ, применяют курсовые и кормовые антибиотики, однако при их длительном и нерациональном использовании снижается резистентность организма к грибковым и стафилококковым инфекциям, нарушаются процессы пищеварения, обмена веществ, снижается прирост живой массы и качество животноводческой продукции, в том числе, вследствие содержания в мясном сырье остаточных количеств антибиотических средств.

В связи с этим, в настоящее время большую популярность в ветеринарии приобретают средства природного происхождения из животного и рыбного сырья, обладающие малотоксичностью и устойчивым терапевтическим действием при длительном применении (Старовойтова Н.П., 2004, Иванкина Н.Ф, 2003, Новикова М.В., 2003, Сергеева Г.Х., 2011). Биологически активные вещества (БАВ), выделенные из вторичных продуктов животноводства, в том числе эндокринно-ферментного сырья, могут использоваться в качестве основы для создания средств, направленных на коррекцию патологий ЖКТ свиней, в т.ч. кормовых добавок, которые, отличаясь высокой эффективностью, отсутствием эффектов привыкания и отмены, не будут влиять на качество животноводческой продукции. Кроме того, в современных экономических условиях глобального снижения производственной мощности предприятий, переработка и использование вторичного сырья в качестве кормовых добавок будет способствовать увеличению объёма выпускаемой продукции и рентабельности при реализации побочного сырья.

Степень разработанности темы. Начиная с 30-х годов прошлого века, во ВНИИМП проводились работы по изучению биологических свойств веществ, содержащихся в эндокринно-ферментном и специальном сырье, разрабатывались

ферментные и органные препараты, такими учеными как Горбатов В.М., Гуров В.А., Белоусов А.А., Стекольников Л.И., Александрова Н.А., Алехина Л.В.

В период 2007-2013 гг. была разработана кормовая добавка «Колимак», представляющая собой лиофильно высушенные водные экстракты поджелудочной железы, слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки свиней, содержащая в качестве активных начал смесь ферментов, проферментов и белково-пептидных комплексов. Модельные (*in vivo*) и клинические исследования на поросятах показали высокий терапевтический и профилактический эффект кормовой добавки при расстройствах пищеварения. С развитием методов выделения и современных знаний об определяющей роли коротких пептидов, возникла необходимость удаления балластных примесей и концентрирования целевых БАВ для увеличения эффективности и биодоступности кормовой добавки. Данный аспект определяет актуальность совершенствования технологии выделения БАВ из вторичного сырья животного происхождения для повышения их содержания, сохранности и контроля в готовом продукте за счёт изменения отдельных стадий, а также детального анализа белково-пептидного состава.

Цель работы. Совершенствование технологии получения целевых биологически активных веществ из эндокринно-ферментного сырья и создание высокоэффективной кормовой добавки для повышения продуктивности и профилактики заболеваний ЖКТ поросят.

Задачи исследования:

1. Провести анализ способов совершенствования технологии выделения биологически активных веществ из эндокринно-ферментного сырья.

2. Изучить влияние параметров экстракции на выход белково-пептидных веществ и их сохранность при различных режимах экстракции путем определения белково-пептидного и аминокислотного состава исследуемых экстрактов органов.

3. Определить режимы фракционирования с целью совершенствования технологии кормовой добавки путем выявления целевой фракции, подтвердить её биологическую активность методом *in vitro.*

4. Провести комплексные исследования полученной кормовой биологически активной добавки, включая изучение биологической активности, эффективности и безопасности методами *in vitro* и *in vivo*.

5. Разработать комплексный подход к оценке контроля содержания целевых биологически активных веществ в кормовой добавке.

6. Разработать стандарт организации и лабораторный регламент на производство кормовой добавки и рассчитать ее себестоимость.

Научная новизна. Установлено, что подбор оптимальных режимов экстракции позволяет увеличить выход БАВ из эндокринно-ферментного сырья. Применение метода ультрафильтрации способствует удалению балластных веществ и концентрированию целевых биологически активных веществ.

Методом *in vitro* установлено, что активность кормовой добавки коррелирует с увеличением содержания веществ пептидной природы. В исследованиях *in vivo* установлен терапевтический эффект кормовой добавки. Разработан комплексный подход к оценке контроля качества и безопасности кормовой добавки, включающий электрофоретические исследования, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и биологические методы *in vitro* и *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Усовершенствована и научно-обоснована технология биологически активных пептидных веществ животного происхождения, которая может быть использована для получения кормовой добавки для профилактики и лечения заболеваний ЖКТ свиней.

Подобраны методы контроля процессов экстракции, очистки и концентрирования биологически активных веществ из эндокринно-ферментного сырья, разработан Лабораторный регламент на производство кормовой добавки, «Программа и методики исследовательских испытаний безопасности, физико-химических свойств, аминокислотного и белково-пептидного состава», СТО 00419779-005-2016 на производство кормовой добавки.

Методология и методы исследования. В работе использованы химические, биохимические и биологические методы, включая методы *in vitro* и *in vivo* для оценки действия БАВ, а также физико-химические, электрофоретические и хромато-масс-спектрометрические исследования для анализа белково-пептидного состава биологически активных веществ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Установлена зависимость влияния параметров экстракции на выход целевых биологически активных веществ из эндокринно-ферментного сырья свиней, определена их сохранность при различных режимах экстракции.

2. Усовершенствована технология кормовой добавки, посредством концентрирования целевых низкомолекулярных биологически активных веществ методом ультрафильтрации.

3. Разработан комплексный подход для контроля содержания биологически активных веществ и определения биологической активности кормовой добавки.

4. Установлено, что усовершенствованная технология позволяет достичь оптимальных характеристик – добавка, являясь слаботоксичной, обладает высокой биологической активностью, улучшает общее состояние животных и способствует нормализации функций пищеварительного тракта.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов работы подтверждается корректным использованием теоретических и экспериментальных методов обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций. Достоверность экспериментальных данных обеспечивается использованием современных средств и методик проведения исследований. Положения теории основываются на известных достижениях фундаментальных и прикладных научных дисциплин, сопряженных с предметом исследования диссертации.

Результаты исследования доложены на: 18-й Международной научно-практической конференции, посвященной памяти Василия Матвеевича Горбатова «Развитие биотехнологических и постгеномных технологий для оценки качества сельскохозяйственного сырья и создания продуктов здорового питания» (г. Москва, 2015); в рамках XIII международной специализированной выставки "Мир биотехнологии 2015" (г. Москва, 2015); X Международной научной конференции студентов и аспирантов «Техника и технология пищевых производств» (г. Могилев, 2016); IV Международной конференции «Биотехнология: наука и практика» (г. Ялта, 2016). Результаты работы были удостоены: Бронзовой медали Всероссийского смотра-конкурса лучших инновационных разработок «За разработку инновационного средства для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных России» (в соавторстве с Федуловой Л.В.) (г. Волгоград, 2013 г.); Персональной стипендии им. В.М. Горбатова в области фундаментальных и прикладных исследований в науке о мясе за 2015 г.; Диплома РАН за победу в конкурсе на лучшую научно-исследовательскую работу в рамках X Международной

научно-практической конференции молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук РАН (г. Москва, 2016 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 3 – в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ.

Личный вклад соискателя

Все изложенные в диссертации результаты получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Постановка задач, интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения и выводов. Список литературы содержит 102 источника, из них 77 российских и 25 зарубежных. Объем работы составляет 122 страницы машинописного текста, содержит 25 рисунков и 23 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность, научная новизна, практическая значимость работы и положения, выносимые на защиту.

В главе 1 «Обзор литературы» проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, обзор производства кормовых добавок и ветеринарных препаратов, в том числе, для лечения патологий ЖКТ продуктивных животных, детально рассмотрена традиционная концепция выделения биологически активных веществ из сырья животного происхождения, приведены литературные данные о тканевой специфичности веществ белково-пептидной природы, содержащихся в эндокринно-ферментном сырье. Анализ публикаций позволил определить цель и сформулировать задачи исследования.

В главе 2 «Организация эксперимента, объекты и методы исследования» представлен методологических подход к проведению исследований в виде схемы (Рисунок 1). Объектами исследований являлись биологически активные вещества, содержащиеся в тканях поджелудочной железы, слизистой оболочки желудка (СОЖ) и двенадцатиперстной кишки свиней.

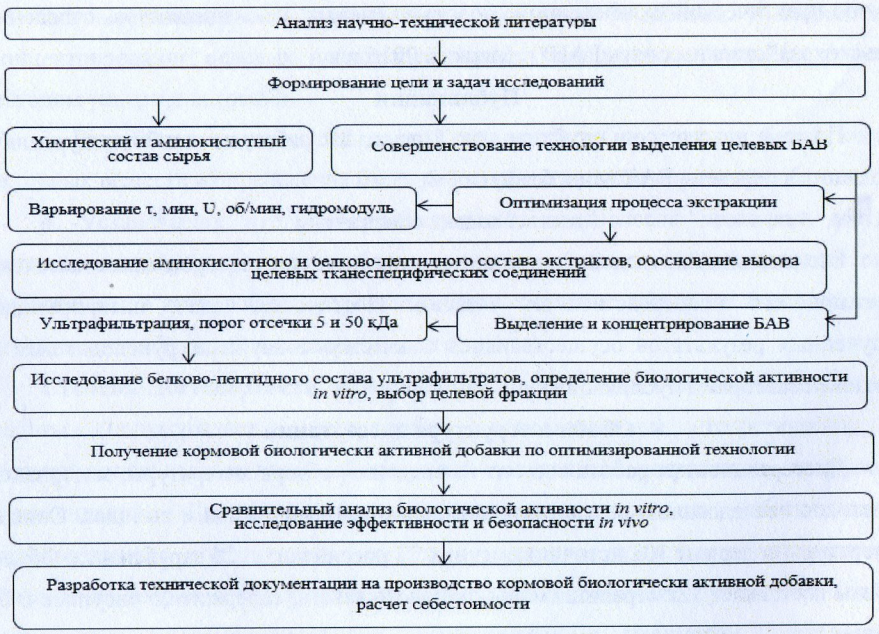

Рисунок 1 – Схема исследования

Определяли: 1 - массовую долю минеральных веществ (золы) определяли по ГОСТ 31727-2012; 2 - жира по ГОСТ 23042-86; 4 - белка по ГОСТ 25011-81 и 5 - биуретовым методом на фотометре BioChem SA (HTI, США); 6-7 - общий и небелковый азот по ГОСТ 25011-81, 8 - белковый азот – по разности между количествами общего и небелкового азота; 9 - аминокислотный состав - методом ионообменной хроматографии на анализаторе Aracus (PMAGmbH, Германия); 10 - протеомный профиль – одномерным электрофорезом по Леммли; 11 - пептидный профиль – на жидкостном хроматографе AGILENT 1200 C с масс-селективным детектором AGILENT 6410 (Agilent Technologies, США). Экстракцию (12) проводили на лабораторной диспергирующей установке с использованием разных типов мешалок (Лаботекс, Россия); ультрафильтрацию (13) – на установке Vivaflow-200 (Santorius, Германия) с использованием мембран (5 кДа и 50 кДа), давлении 2,5 бар. Биологическую активность ультрафильтратов - методом *in vitro* (14) на эксплантатах желудка и кишечника 10-ти суточных куриных эмбрионов (Мальчевский В.А., Петров С.А., 2015); антиульцерогенный эффект и противоязвенную активность - методом *in vivo* (15) на модели острого повреждения слизистой оболочки желудка (16) лабораторных крыс (7 суток, ежедневное внутрижелудочное введение ацетилсалициловой кислоты (3 г/кг веса);

гистологическое исследование (17) тканей желудка (окрашивание гематоксилин-эозином (18)) (Лилли Р., 1969) и анализ препаратов (19) - на световом микроскопе Axio Imager A1, видеокамера AxioCam MRc 5, программа AxioVision Rel.4.6 (Carl Zeiss, Германия). Токсичность исследовали по ГОСТ 32644-2014 (20). Обработку результатов проводили с использованием программ Microsoft Excel и Statistica 10 (StatSoft).

В главе 3 «Результаты исследования сырьевых источников» приведен химический состав исследуемого сырья: показано высокое содержание массовой доли белка (18,90±0,65 %), жира (9,40±1,31 %) и зольных элементов (1,09±1,16%) в поджелудочной железе, превышающие аналогичные показатели в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки, что связано с архитектоникой органа. Анализ аминокислотного состава сырья выявил высокое содержание глутаминовой кислоты (в слизистой оболочке желудка - 14,3 %, двенадцатиперстной кишки - 12,9 %, поджелудочной железе - 11,5 %); глицина, аспарагиновой кислоты и аланина (до 10, 1%, 9,8% и 9,4% соответственно); лизина (в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки – 9,1 % и 7,3 %, в поджелудочной железе – 6,4 %); содержание аргинина - колебалось в пределах 4,0 % – 4,6 %, гистидина не превышало 2,3 %. Содержание остальных нейтральных аминокислот в образцах – достаточно стабильно, без заметных отклонений. В результате проведённого исследования выявлено, что для более полного отделения целевых БАВ от компонентов соединительной ткани возможно применение метода экстракции с использованием в качестве экстрагента изотонического раствора натрия хлорида при температуре (4-5) °С.

В главе 4 «Обоснование режимов и результаты оптимизации технологии кормовой добавки» приведено научное обоснование параметров выделения БАВ по сравнению с традиционной технологией кормовой добавки «Колимак» (Рисунок 2).

В качестве факторов, подлежащих оптимизации, были выделены продолжительность (τ, мин), скорость экстракции (ν, об/мин) и соотношения сырья и экстрагента (гидромодуль). Для интенсификации экстракции была использована лабораторная диспергирующая установка, высокая скорость перемешивания которой обеспечивает мгновенную конвективную экстракцию, сокращая время экстракции до нескольких часов. Индивидуально подобраны типы мешалок для каждого вида сырья: для экстракции поджелудочной железы и слизистой оболочки желудка - пропеллерная мешалка, создающая осевой поток и увеличивающая поверхность контакта твердой фазы с жидкой; для слизистой двенадцатиперстной кишки - якорная, ввиду высокой вязкости сырья во избежание локального перегрева экстракта и образования осадка.

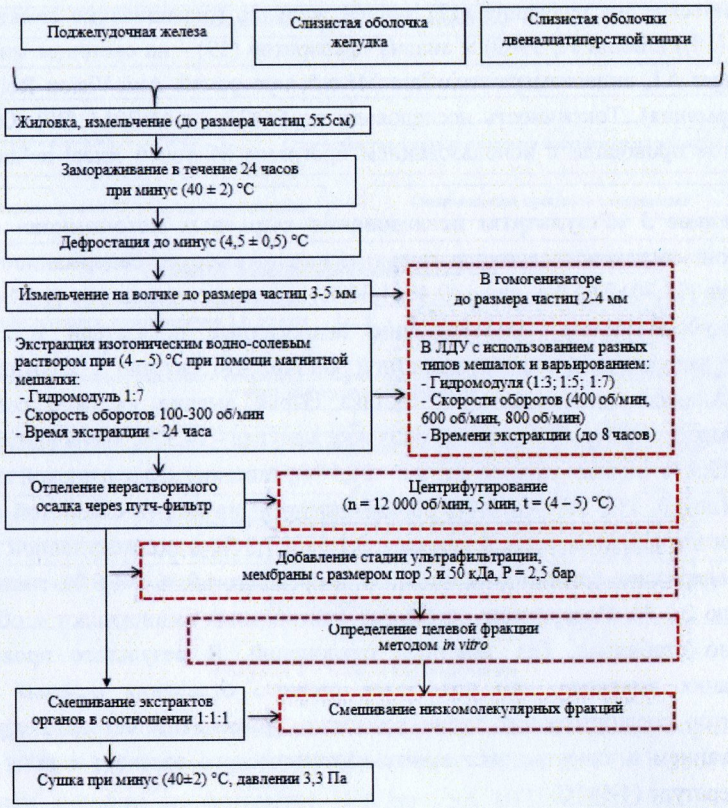

Рисунок 2 – Схема оптимизации технологии получения кормовой добавки

В качестве скринингового метода, определяющего содержание целевых биологически активных компонентов, выбрана концентрация белка в экстрагенте (г/л), белково-пептидный и аминокислотный составы.

В первой серии экспериментов по оптимизации технологии выделения БАВ исследуемыми параметрами экстракции служили скорость перемешивания и продолжительность экстракции при гидромодуле 1:5 и использованием в качестве экстрагента 0,9 % раствор натрия хлорида.

В «нулевых пробах» количество белка в экстракте поджелудочной железы составило 5,8–7,9 г/л; при 800 об/мин максимальная концентрация белка составляла 32,45 г/л через 6 ч, при 600 об/мин - 32,15 г/л (2 ч), при 400 об/мин изменяясь синусоидально, не превысила 31,3 г/л (Рисунок 3, А). Концентрация белка в «нулевой пробе» экстракта слизистой оболочки желудка варьировалась от 0,71 до 1,02 г/л, однако при 800 об/мин достигала 12,7 г/л через 4 ч, при 600 об/мин - 12,7

г/л через 3 ч, при 400 об/мин не превысила отметки 11,6 г/л (7 ч) (Рисунок 3, Б). «Нулевая проба» экстракта слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки содержала от 0,64 до 0,91 г/л белка и при 800 об/мин характеризовалось плавным увеличением содержанием белка до 16,28 г/л на 3 ч, при 600 об/мин через 2 ч достигла отметки 16,28 г/л, при 400 об/мин - 16,13 г/л в течение 6 ч (Рисунок 3, В). Сравнительный анализ влияния скорости перемешивания на выход компонентов белковой природы выявил, что оптимальной скоростью является 600 об/мин (максимальная концентрация белковых компонентов при экстракции поджелудочной железы и слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки - 2 ч, слизистой оболочки желудка – 3 ч); экстракция при 800 об/мин характеризуется обильным пенообразованием, при 400 об/мин – содержание белка в экстрактах было ниже, что связано с ферментолизом и автолизом белковых компонентов.

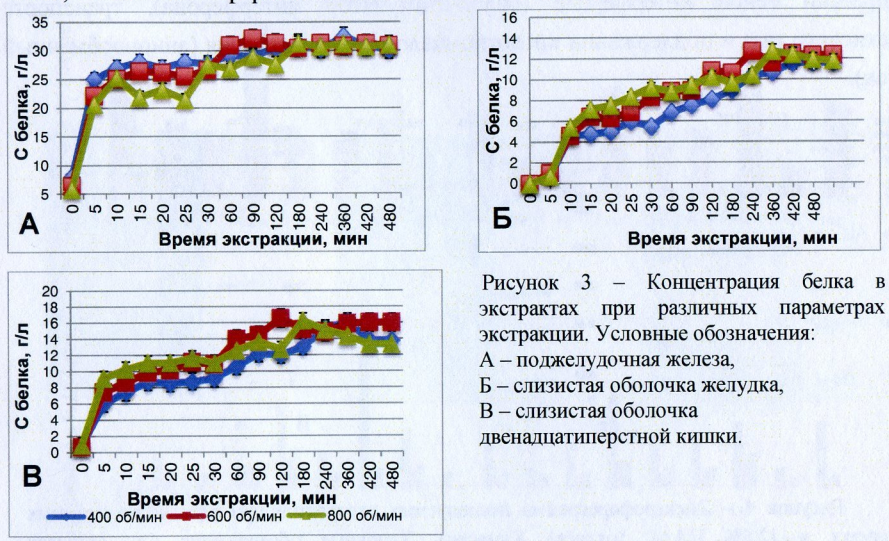

Рисунок 3 – Концентрация белка в экстрактах при различных параметрах экстракции. Условные обозначения:
А – поджелудочная железа,
Б – слизистая оболочка желудка,
В – слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки.

Следующая серия экспериментов заключалась в обосновании оптимальной величины жидкостного модуля при оптимальных режимах экстракции для каждого вида сырья. Максимальный выход белка отмечен при соотношении сырье:экстрагент – 1:5. Электрофоретические исследования экстрактов показали идентичность треков при варьировании гидромодуля по качественному составу, однако отмечены различия по количественному составу (Рисунок 4). Отмечено, что в исследуемых экстрактах наравне с мажорными структурными белками присутствует ряд минорных белково-пептидных соединений, характеризующие функциональную специфичность. Анализ протеомных профилей в соответствии с базой данных UniProt DataBase показал, что в экстрактах поджелудочной железы – в

диапазоне молекулярных масс от 50 до 30 кДа и от 15 до 5 кДа, предположительно присутствуют соединения, участвующие в активации рецепторов желудочных ингибиторов (ген GIPR) и метаболизме глюкозы (инсулин, глюкагон), в восстановлении экзокринной функции поджелудочной железы и формировании клеточного иммунитета (белки ISL1 и MNX1), в процессах восстановления клеток поджелудочной железы, пролиферации клеток и регуляции процессов апоптоза (дезоксирибонуклеаза-1, NKX3-2, PTF1A). В экстрактах слизистой оболочки желудка – от 70 до 30 кДа предположительно содержатся функциональные белки и ферменты, участвующие в водно-солевом, ионном и трансмембранном транспорте (аквапорин-3, бета-субъединица H (+)/ K (+)-АТФазы, АТФ-связанный кассетный транспортер подсемейства G), в механизме врожденного иммунитета и индукции экспрессии генов интерферона (белок-стимулятор интерферона), транспорте углекислого газа и поддержании кислотно-щелочного равновесия (анионообменный белок).

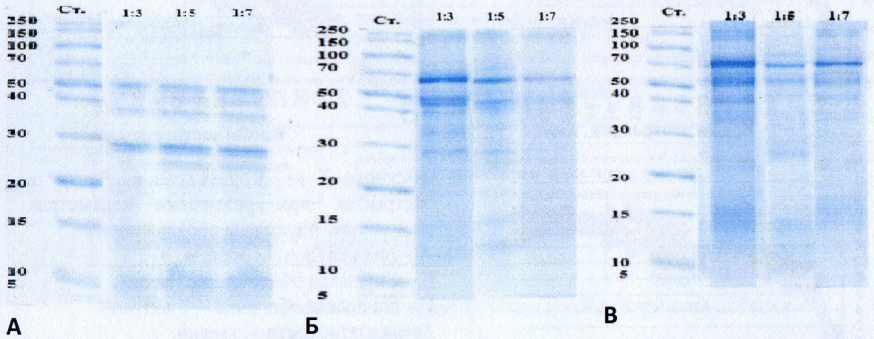

Рисунок 4 – Электрофореграмма исследуемых экстрактов при разных жидкостных модулях в 12,5% ПААГ (окраска Кумасси). Условные обозначения: Ст- стандарт молекулярных масс, кДа; А – поджелудочная железа, Б – слизистая оболочка желудка, В – слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки.

В экстрактах двенадцатиперстной кишки в диапазоне молекулярных масс от 150 до 30 кДа и от 15 до 10 кДа предположительно присутствуют соединения, участвующие в ферментативных процессах в организме (цитохром B-редуктаза, цитохром C-оксидаза) и активации ингибиторов пептидаз (ингибитор Na+/K+ - АТФазы)A2, в процессах гуморального иммунитета (фосфолипаза A2), в реакциях врожденного иммунного ответа и воспалительных процессах (белок 88-миелоидной дифференцировки первичного генного ответа).

Таким образом, оптимальной величиной соотношения сырье:экстрагент является 1:5, что коррелирует с концентрацией выхода белка в экстрагент. Анализ аминокислотного состава (Рисунок 5) показал, что полученные при оптимальных режимах экстракты характеризуются присутствием полного спектра незаменимых и заменимых аминокислот, за исключением цистеина (в экстрактах слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки). При этом содержание свободных аминокислот в экстракте поджелудочной железы в 2-4 раза превышает содержание аминокислот в экстрактах слизистых желудка и двенадцатиперстной кишки, что может свидетельствовать о высокой активности протеолитических ферментов поджелудочной железы.

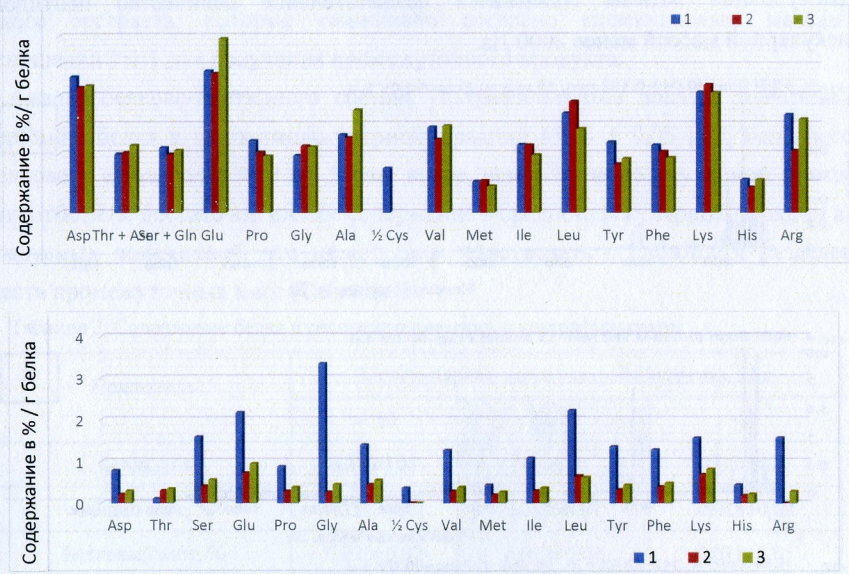

Рисунок 5 – Содержание аминокислот в экстрактах. Условные обозначения: А – общий аминокислотный состав; Б – свободные аминокислоты; 1 – экстракт поджелудочной железы; 2 – экстракт слизистой оболочки желудка; 3 – экстракт слизистой двенадцатиперстной кишки.

Протеомный профиль экстрактов (Рисунок 6), полученных при оптимальных режимах экстракции, включал в себя тканеспецифичные белки и пептиды, определяющие биологические свойства тканей.

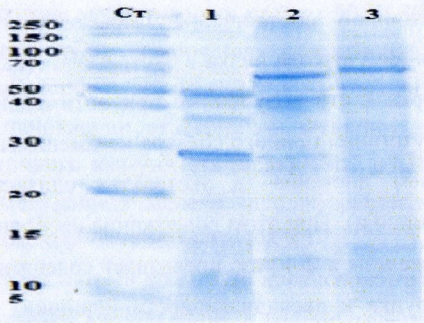

Рисунок 6 – Электрофорез экстрактов 12,5 % ПААГ (Окраска Кумасси).
Условные обозначения:
Ст. – стандарт молекулярных масс, кДа;
1 – экстракт поджелудочной железы;
2 – экстракт слизистой оболочки желудка;
3 – экстракт двенадцатиперстной кишки.

Анализ пептидного профиля показал (Рисунок 7), что в экстракте поджелудочной железы содержится незначительное количество пептидов с молекулярной массой менее 2000 Да.

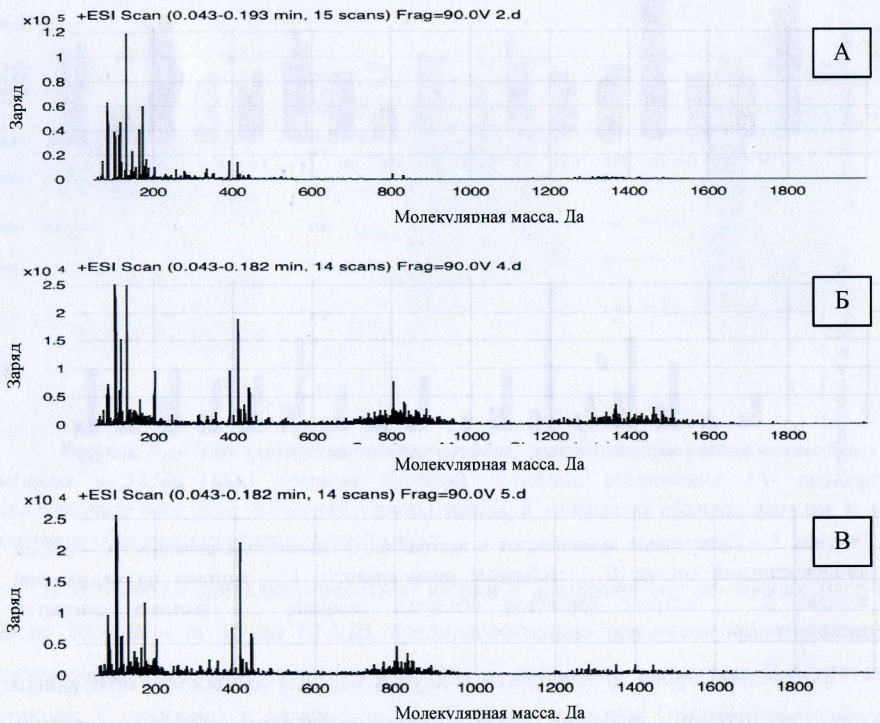

Рисунок 7 – Пептидный профиль исследуемых экстрактов. Условные обозначения: А – поджелудочная железа; Б – слизистая оболочка желудка; В – двенадцатиперстная кишка

Обнаружено 16 тканеспецифичных пептидов (до 400 Да), в экстрактах слизистой оболочки желудка выявлено 33 тканеспецифичных пептида (до 1600 кДа), в экстрактах двенадцатиперстной кишки - 35 пептидов (до 1000 кДа). Во всех экстрактах обнаружено 13 сходных пептидов, в экстрактах слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки - 9 сходных пептидов.

С целью совершенствования технологии, в том числе сохранения, концентрирования целевых БАВ и удаления балластных соединений, был применён метод ультрафильтрации с целью фракционирования экстрактов по молекулярным массам. В качестве разделяющего порога, при помощи нейтральных мембран из полиэфирсульфона, были выбраны размеры пор 5 кДа и 50 кДа, и получены высоко- (Мм >50 кДа), средне- (Мм 50-5 кДа) и низкомолекулярные (Мм < 5кДа) фракции каждого экстракта, которые смешивали согласно молекулярным массам в соотношении 1:1:1 для получения промежуточного продукта.

Анализ белково-пептидного состава ультрафильтратов показал значительное содержание белка в высокомолекулярной фракции (5,18 ± 0,05 г/л), белкового и небелкового азота более чем в 1,5 раза выше, чем в низкомолекулярной фракции. Стоит отметить, достаточно низкое содержание в среднемолекулярной фракции всех исследуемых показателей, что может свидетельствовать о сложности разделения веществ промежуточных масс (Таблица 2).

Таблица 2. Содержание белка и распределение азота в ультрафильтратах

Показатель	Молекулярная масса ультрафильтратов, кДа		
	> 50	50-5	< 5
Белок, г/л	5,18±0,05	0,6±0,03	1,35±0,05
Общий азот, %	0,051 ±0,01	0,018±0,01	0,028±0,02
Белковый азот, %	0,020±0,02	0,012±0,02	0,011±0,01
Небелковый азот, %	0,031±0,03	0,006±0,01	0,017±0,02

Анализ пептидного состава ультрафильтратов (Рисунок 8) показал, что высокомолекулярная фракция характеризуется присутствием 35 тканеспецифичных пептидов, среднемолекулярная – 13 пептидов и низкомолекулярная – 7 пептидов. Высокое содержание пептидов в высокомолекулярной фракции свидетельствует об активности ферментов поджелудочной железы, которая обуславливает высокую степень протеолиза в нативном экстракте.

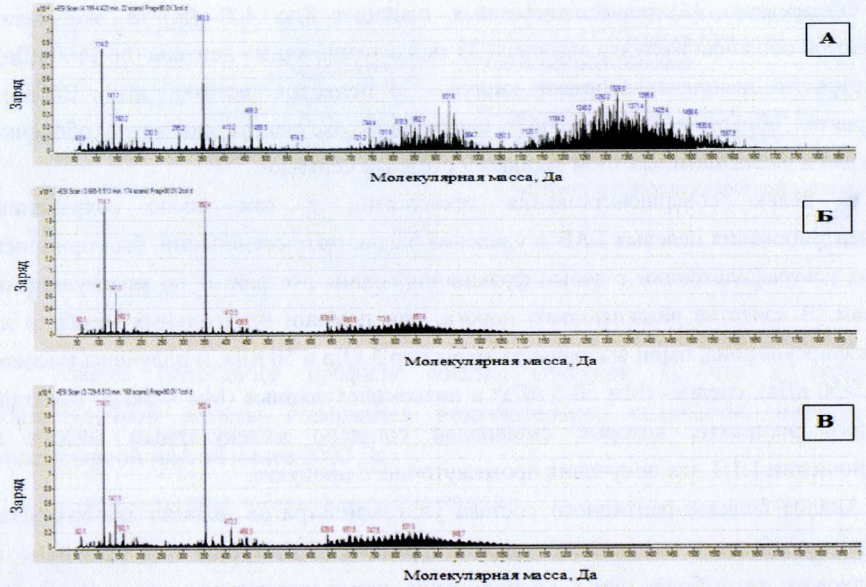

Рисунок 8 – Пептидный профиль ультрафильтратов. Условные обозначения: А – высокомолекулярная фракция, Б – среднемолекулярная фракция, В – низкомолекулярная фракция.

Результаты исследования биологической активности ультрафильтратов *in vitro* выявили, что низкомолекулярный ультрафильтрат в концентрации 100 и 150 нг/мл стимулировали рост тканей желудка куриного эмбриона (ИП эксплантатов превышал контрольные значения более чем на 60% (n = 44)); высоко- и среднемолекулярные ультрафильтраты в аналогичных концентрациях незначительно влияли на рост ткани желудка – ИП не превышал 18 % (n = 88).

Таблица 3. Влияние ультрафильтратов на рост эксплантатов желудка и кишечника куриного эмбриона (индекс площади в % к исходной площади эксплантата)

Концентрация вещества (нг белка/мл)	Ультрафильтраты, Мм, кДа		
	> 50	50-5	< 5
Эксплантаты желудка			
100	112,4±3,2	118,8±5,9	160,2±1,6
150	121,1±2,8	127,5±5,1	164,7±2,5
Эксплантаты кишечника			
100	122,6±2,9	101,8±1,1	150,8±2,2
150	125,1±1,5	103,8±3,0	154,6±3,4

Высокомолекулярные ультрафильтраты в концентрации 100 и 150 нг/мл незначительно стимулировали рост ткани кишечника (ИП не превышал 25%), среднемолекулярные фракции не оказывали влияния на ИП, низкомолекулярный ультрафильтрат вызывал достоверное увеличение ИП (более чем на 50 %) эксплантатов кишечника в концентрациях 100 и 150 нг/мл. Таким образом, низкомолекулярная фракция смеси экстрактов в концентрации 150 нг/мл обладает наибольшей биологической активностью.

В главе 5 описана усовершенствованная технология кормовой добавки (Рисунок 9), согласно которой была выработана опытная партия.

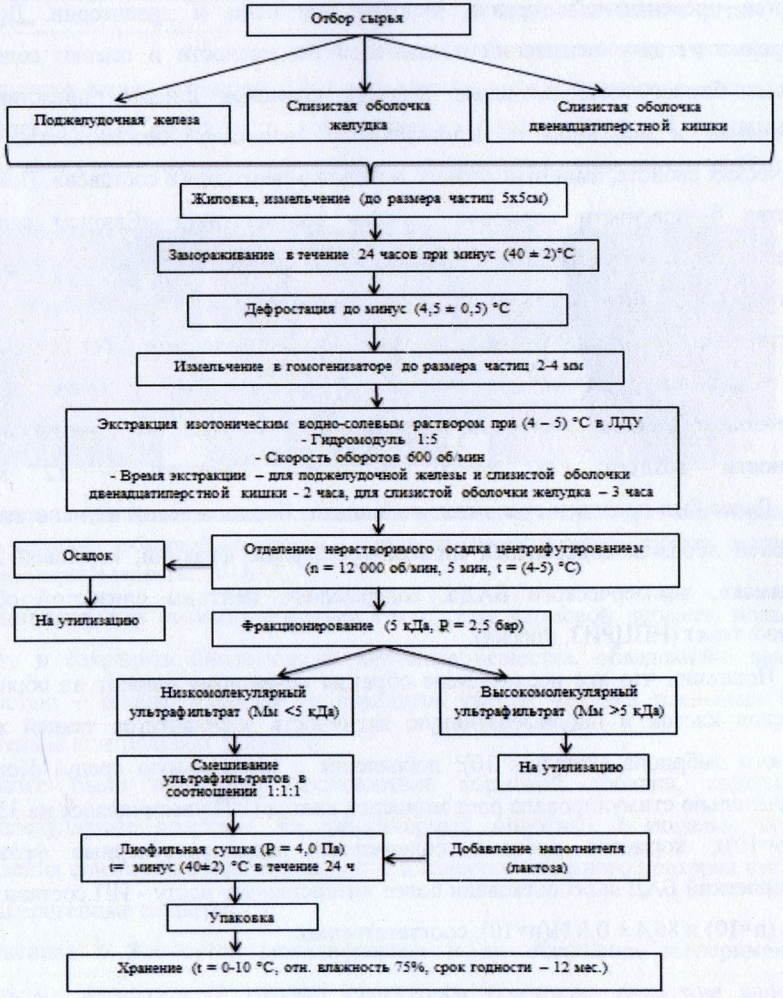

Рисунок 9 - Технологическая схема получения кормовой добавки

Подробное изложение технологии кормовой добавки, включающий расчет потерь целевых веществ на каждом этапе технологического процесса представлен в Лабораторном регламенте.

Кормовая добавка представляет собой лиофильно высушенный порошок светло-коричневого цвета, со специфическим запахом. Массовая доля белка не менее 3,0 %, поваренной соли – не более 30,0 %, влаги – не более 3,0 %, наполнитель (лактоза) – не более 64,0 %. Предназначена для повышения сохранности и продуктивности свиней, в том числе поросят - отъемышей, а также в качестве превентивной терапии диареи, диспепсии и дизентерии. Детальное изложение методов испытаний показателей безопасности и оценки содержания целевых биологически активных веществ кормовой добавки представлено в «Программе и методиках исследовательских испытаний безопасности, физико-химических свойств, аминокислотного и белково-пептидного составов». Показатели качества безопасности кормовой добавки соответствует «Единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)». Требования к составу, качественным характеристикам и безопасности приведены в СТО 00419779-005-2016 «Добавка кормовая для свиней». Кормовую добавку хранят в сухом, защищенном от света помещении, при температуре не выше 10 °С и относительной влажности воздуха (75 ± 5) %. Срок годности – 12 месяцев.

Далее был проведен сравнительный анализ биологической активности *in vitro* кормовой добавки, содержащей низкомолекулярные фракции, кормовой добавки «Колимак», коммерческого БАДа, содержащего пептиды слизистой оболочки желудка телят (НПЦРИЗ, Россия).

Показано, что все исследуемые образцы по-разному влияют на образование монослоя клеток и пролиферативную активность эксплантатов тканей желудка куриного эмбриона (Рисунок 10): добавление в питательную среду «Колимака» незначительно стимулировало рост монослоя клеток (ИП увеличивался на 33,9 ± 0,5 % (n=10)); кормовая добавка, содержащая низкомолекулярные фракции и коммерческий БАД способствовали более интенсивному росту - ИП составил 90,8 ± 0,3 % (n=10) и 86,4 ± 0,6 %(n=10), соответственно.

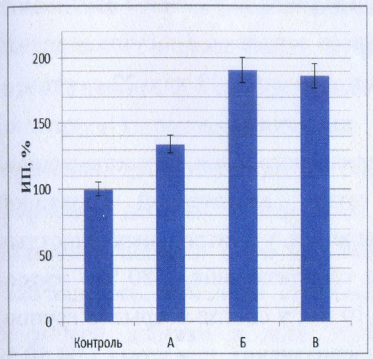

Рисунок 10 – Влияние исследуемых образцов на рост эксплантатов тканей желудка куриного эмбриона: ИП – индекс площади в % к исходной площади эксплантата; А – кормовая добавка «Колимак»; Б – кормовая добавка, содержащая низкомолекулярные биологически активные вещества; В – БАД.

Микроскопическое исследование фиксированных и окрашенных эксплантатов желудка показало, что периферическая зона роста органных культур при добавлении в питательную среду «Колимака» неоднородна, пролиферация эпителиоцитов менее выражена. При добавлении кормовой добавки, содержащей низкомолекулярные фракции, и коммерческого БАДа зона роста представлена плотным монослоем пролиферирующих и мигрирующих эпителиоцитов (Рисунок 11).

Рисунок 11 – Микроскопическое исследование эксплантатов желудка куриного эмбриона. Ув 20х: А – кормовая добавка «Колимак»; Б – оптимизированная кормовая добавка, содержащая низкомолекулярные вещества; В – БАД.

Выявлено, что оптимизированная технология кормовой добавки, позволяет получить и сохранить биологически активные вещества, обладающие высокой активностью – индекс площади эксплантатов тканей желудка превышал 90 % относительно контрольных значений.

Далее было проведено исследование кормовой добавки, содержащей низкомолекулярные вещества, на лабораторных животных с моделью острого повреждения слизистой оболочки желудка, в качестве основного критерия выбраны антиульцерогенные свойства.

Начиная с 3-х суток моделирования и до окончания эксперимента у контрольных животных (2 группа) отмечалось угнетение, снижение аппетита, двигательной активности, учащение актов дефекации и размягчение фекалий,

потеря веса во время моделирования. При введении кормовой добавки животным 3-й группы, наблюдалась стабилизация состояния и веса начиная с 8-х суток и вплоть до 22-х суток. У крыс 2-й группы стабилизация веса отмечена с 13-х по 22-е сутки.

Исследование СОЖ показало, что у интактных крыс (1 группа) характеризовалась выраженным рельефом эпителиального слоя, представленным столбчатым железистым эпителием, с четко выраженной полярной дифференциацией, без признаков отечности и гиперемии, у контрольных животных (2 группа) в 100 % случаев отмечались точечные кровоизлияния, в 80 % - эрозии неправильной и круглой формы, размером от 2 до 10 мм; у опытных крыс (3 группа) выявлена незначительная отечность и точечные кровоизлияния, при этом СОЖ 50 % крыс соответствовала физиологической норме (Таблица 4).

Таким образом, кормовая добавка, содержащая низкомолекулярные вещества, обладает выраженной антиульцерогенной активностью – противоязвенная активность превышает 2 единицы.

Таблица 4 – Влияние кормовой на процесс язвообразования после моделирования острого повреждения СОЖ

Группа	2 группа (контроль)	3 группа (опыт)
Число животных с язвами, %	80	60
Число язв на 1 крысу	7,37 ±0,08	2,40±0,03
Число животных с точечными кровоизлияниями, %	100	40
Число точечных кровоизлияний на 1 крысу	2,3	1,5
Индекс Паулса для язв, %	5,9	1,5
Индекс Паулса для точечных кровоизлияний, %	2,3	0,6
Противоязвенная активность	1	3,93

Гистологические исследования желудка показали, что у интактных животных в фундальном отделе хорошо различим высокопризматический эпителий слизистой оболочки, собственная пластинка, желудочные ямки и собственные железы дна желудка. У контрольных животных выявлено выраженное набухание обкладочных клеток, десквамация покровного эпителия слизистой оболочки, метаплазией железистых клеток желудка, отмечается фиброз собственной пластинки. На срезах желудков опытных животных - слабая атрофия желез, слущивание покровного эпителия, набухание клеток собственной пластинки слизистой оболочки, строма слизистой оболочки без патологии.

Выявлено, что кормовая добавка, содержащая низкомолекулярные вещества, способствует нормализации функций пищеварительного тракта крыс при остром повреждении СОЖ лабораторных крыс.

Для определения острой токсичности кормовой добавки были изучены предельно допустимые дозы – 5000 и 2000 мг/кг. При внутрижелудочном введении кормовой добавки в дозе 5000 мг/кг признаков интоксикации после введения кормовой добавки и на протяжении всего периода наблюдения у животных не наблюдалось, отмечено стабильное увеличение массы животных. При введении кормовой добавки в дозе 2000 мг/кг также не отмечено токсикологических эффектов, животные стабильно набирали массу в течение 14 суток наблюдения. Отсутствие признаков интоксикации у лабораторных животных в исследовании безопасности позволяет отнести кормовую добавку, содержащей низкомолекулярные вещества, к IV классу опасности согласно ГОСТ 12.1.007.

На основании выполненных исследований разработаны: СТО 00419779-005-2016 «Добавка кормовая для свиней», «Программа и методики исследовательских испытаний безопасности, аминокислотного и белково-пептидного составов» и Лабораторный регламент на производство кормовой добавки.

Себестоимость производства кормовой добавки, содержащей низкомолекулярные фракции биологически активных веществ, составляет 308,6 руб. на 100 г, при фасовке по 15 г (норма ввода на 10 поросят-отъемышей) – 46,29 руб.

ВЫВОДЫ

1. Проведенный анализ совершенствования технологии кормовой добавки выявил, что для увеличения эффективности и биодоступности биологически активных веществ необходимо оптимизировать параметры экстракции за счет варьирования величины гидромодуля, скорости и времени перемешивания. Установлены оптимальные параметры выделения БАВ, включающие: соотношение сырье : экстрагент – 1:5, скорость перемешивания – 600 об/мин, время экстракции для поджелудочной железы и двенадцатиперстной кишки – 2 часа, слизистой оболочки желудка – 3 часа.

2. Выявлено присутствие в экстрактах поджелудочной железы, слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки белково-пептидных веществ в диапазоне молекулярных масс от 50 до 30 кДа и менее 20 кДа. Анализ пептидного профиля выявил наличие в экстракте поджелудочной железы 16 тканеспецифичных

пептидов, в экстрактах слизистой оболочки желудка – 33 и двенадцатиперстной кишки - 35.

3. Установлено, что смесь низкомолекулярных фракций экстрактов исследуемых органов (Мм менее 5 кДа), обладает высокой биологической активностью в исследованиях *in vitro*. Индекс площади эксплантатов желудка и кишечника куриного эмбриона превышал 50 %, относительно контроля. За счет оптимизации параметров экстракции, выделения и концентрирования низкомолекулярных биологически активных веществ усовершенствована технология кормовой добавки.

4. В эксперименте *in vivo* выявлена антиульцерогенная активность (превышает 2 единицы) полученной кормовой биологически активной добавки. Показано, что усовершенствованная технология позволяет получить безопасный продукт, обладающий высокой биологической активностью в сравнении с традиционной технологией кормовой добавки.

5. Разработана «Программа и методики исследовательских испытаний безопасности, физико-химических свойств, аминокислотного и белково-пептидного составов» для оценки показателей безопасности и контроля содержания целевых биологически активных веществ в кормовой добавке.

6. Разработаны СТО 00419779-005-2016 «Добавка кормовая для свиней» и Лабораторный регламент на производство кормовой добавки. Себестоимость производства кормовой добавки составляет 308,6 руб. на 100 г.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

Научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК

1. Чернуха, И.М. Разработка ферментно-тканевого препарата для лечения желудочно-кишечных расстройств на основе экстрактов тканей желудка и двенадцатиперстной кишки и поджелудочной железы свиней / И.М. Чернуха, Б.В. Уша, А.Н. Макаренко, Л.В. Федулова, Т.С. Елизарова, **Э.Б. Арашанова** // Ветеринария и кормление. – № 4. – 2012. – С. 12–14.

2. Федулова, Л.В. Исследования *in vivo, in vitro, ex vivo*: оценка заявленных свойств и изучение токсичности как неотъемлемые этапы создания продуктов здорового питания / Л.В. Федулова, Е.А. Котенкова, Е.Р. Василевская, **Э.Б. Арашанова** // Все о мясе. – № 6. – 2015. – С. 32–33.

3. Федулова Л.В. Исследование *in vitro* биологически активных веществ животного происхождения / Л.В. Федулова, **Э.Б. Кашинова** // Все о мясе. – 2016. – №4. – С. 30–33.

Научные статьи в зарубежных журналах

4. **Kashinova, E.B.** Technological Approaches to Isolation of Biologically Active Substances from the Tissues of Pancreas, Duodenum, and Gastric Mucosa / E.B. Kashinova, E.A. Kotenkova, E.A. Ertikeeva, A.G. Akhremko, I.M. Chernukha // JBR Journal of Translational Diagnostics and Technology. – 2016. - 1(2). – P.7–10.

Публикации в других научных изданиях

5. Федулова, Л.В. Использование вторичного сырья при разработке лечебно-профилактического средства для ветеринарии / Л.В. Федулова, Е.Р. Василевская, **Э.Б. Арашанова** // В сборнике: Новые подходы, принципы и механизмы повышения эффективности производства и переработки сельскохозяйственной продукции Материалы Международной научно-практической конференции. Под общей редакцией И.Ф. Горлова; ГНУ Поволжский НИИ производства и переработки мясомолочной продукции Россельхозакадемии, Волгоградский государственный технический университет. Волгоград. – 2014. – С. 81–83.

6. **Кашинова, Э.Б.** Оптимизация технологических режимов выделения биологически активных веществ из сырья животного происхождения / Э.Б. Кашинова, Е.А. Котенкова, Е.А. Ертикеева, А.Г. Ахремко // Актуальная биотехнология. – 2016. – №1 (16). – С. 17–22.

7. **Кашинова, Э.Б.** Создание кормовой добавки из вторичного сырья для профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных / Э.Б. Кашинова, Е.А. Котенкова, Е.А. Ертикеева, А.Г. Ахремко // Техника и технология пищевых производств: тез. докл. X Междунар. науч. конф. студентов и аспирантов, 28-29 апреля 2016 г., Могилев / Учреждение образования "Могилевский государственный университет продовольствия". - Могилев: МГУП, 2016. – С. 8–11.

8. **Кашинова, Э.Б.** Исследование *in vitro* биологической активности низкомолекулярных фракций, выделенных из органов желудочно-кишечного тракта свиней / Э.Б. Кашинова // Материалы X Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук РАН «Современные подходы к получению и переработке сельскохозяйственной продукции – гарантия продовольственной независимости России». – 2016. – С. 126–130.