

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский государственный аграрный университет –
МСХА имени К.А. Тимирязева»

На правах рукописи

ХАМВИ МОХАМАД НАВАР

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА ПРОТЕАЗ И
КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ФОРМ АМИНОКИСЛОТ В КОРМЛЕНИИ
ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ**

4.2.4. Частная зоотехния, кормление, технологии приготовления кормов и
производства продукции животноводства

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Шаповалов Сергей Олегович

Москва - 2026 г.

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.....	4
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1	Современные аспекты и тенденции применения кормовых протеаз в России и за рубежом в кормлении птицы и животных	13
1.2	Особенности лабораторного анализа протеаз и оценки их активности	18
1.3	Физико-химические свойства кормового протеина как субстрата для протеолитических ферментов	25
1.4	Протеолитическая система желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных птиц	30
1.5	Тренды протеинового и аминокислотного питания в нутрициологии животных	36
1.6	Методология использования показателей переваримости сухого вещества и протеина <i>in vitro</i>	39
2	МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	42
2.1.	Лабораторные исследования <i>in vitro</i>	43
2.2.	Эксперименты <i>in vivo</i>	46
2.3.	Зоотехнический, биохимический и статистический анализ	53
2.4.	Характеристика ферментных препаратов	55
3	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	57
3.1	Валидация и верификация методов оценки активности протеаз с использованием методик разных производителей	57
3.2	Применение разных методов и подходов для оценки переваримости сухого вещества, сырого протеина мясокостной и перьевой муки <i>in vitro</i>	72
3.3	Использование различных уровней протеаз в кормлении цыплят-бройлеров	83

3.4	Подходы к балансированию низкопротеиновых растительных рационов бройлеров кристаллическими формами аминокислот для повышения продуктивности цыплят бройлеров	85
3.5	Практический потенциал применения разных концентраций комплекса протеаз, кристаллических форм аминокислот в низкопротеиновых рационах бройлеров с включением перьевой муки	100
3.6	Экологическая эффективность применения протеаз и кристаллических аминокислот в стратегиях снижения сырого протеина в рационах и экскреции азота с пометом в бройлерном производстве	113
3.7	Производственная проверка и экономическая эффективность	118
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
	ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ	129
	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕГО ИССЛЕДОВАНИЯ	130
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	131
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	153

Введение

Актуальность темы. Перед мировым сельским хозяйством уже не первое десятилетие стоит задача: как наращивать производство продовольствия для растущего населения планеты, если ресурсы ограничены, а экологические требования постоянно ужесточаются. Птицеводство в этом смысле оказалось наиболее эффективным сектором животноводства. Мясо птицы отличается высокой пищевой ценностью, коротким производственным циклом и лучшей конверсией корма среди всех видов мяса, и на него приходится около 40 % мирового потребления животного белка. Но дальнейшая интенсификация отрасли упирается в целый клубок взаимосвязанных экономических и экологических ограничений.

Главное из них — стоимость кормов, которая доходит до 70 % себестоимости конечной продукции. Основные расходы при этом приходятся на протеиновые компоненты. Параллельно с экономическим давлением отрасль испытывает и экологическое: нужно сокращать выбросы азота. В традиционном птицеводстве потери азота очень велики — до 50 % и более от того количества, которое поступает с кормом, не усваивается птицей и уходит с помётом в окружающую среду, загрязняя водоёмы, почву и атмосферу.

Частично эту проблему в мировой практике решают за счёт экзогенных протеолитических ферментов. Эти добавки, которые вводят в комбикорма, повышают доступность питательных веществ из растительного сырья. В фокусе исследований последних лет — целенаправленное снижение сырого протеина в рационе при точной балансировке незаменимых аминокислот синтетическими кристаллическими формами. Накопленные за пять лет данные показывают: уменьшение сырого протеина на 2–4 % с добавлением кристаллических аминокислот не снижает продуктивность бройлеров. Выделение азота при этом заметно падает, как и нагрузка на окружающую среду. Для работоспособности такого подхода нужны специфические экзогенные протеазы, способные расщеплять прочные пептидные связи кератина. В подобных схемах протеазы действуют по двум направлениям.

Прямое — расщепление основного белка корма, за счет чего растет доступность аминокислот. Косвенное — инаktivация белковых антинутриентов: ингибиторов трипсина и химотрипсина, аллергенных белков, лектинов (агглютининов), полифенолоксидаз, липоксигеназ, уреаз и ингибиторов амилазы. Совокупный результат — улучшение нутритивного статуса, рост переваримости корма и оптимизация физиологического состояния птицы. Для низкопротеиновых рационов с перьевой мукой и кукурузным глютенотом такая коррекция должна быть особенно точной. Прежде всего она направлена на компенсацию дефицита тех аминокислот, которые становятся лимитирующими при снижении СП, — валина и изолейцина.

Из этого следует, что комплексные исследования по разработке и обоснованию технологии синергетического применения специфических протеаз и кристаллических аминокислот в низкопротеиновых рационах бройлеров с включением перьевой муки и труднорасщепляемых белков кукурузы — это не только актуальная научная задача, но и практическая необходимость. Без неё сложно обеспечить конкурентоспособность и устойчивое развитие отечественного птицеводства.

Степень разработанности темы. Тема диссертационного исследования является современной и актуальной, как протеиновому, так и аминокислотному питанию птицы, а также снижению себестоимости продукции, повышению эффективности использования ресурсов и минимизации экологической нагрузки. Работа посвящена комплексному решению проблемы повышения питательной ценности и эффективности использования низкопротеиновых рационов для бройлеров за счёт синергетического применения комплекса протеаз и кристаллических аминокислот. Усилия зарубежных и отечественных исследователей распределились по разным аспектам этой проблемы и охватили весь обозначенный круг вопросов. Среди авторов — Крючков И.А., Никишов А.А. (2025); Буряков Н.П. и др. (2023); Коуисон А.Дж. и др. (2020); Цзуо Дж. и др.

(2020); Кебреаб Э. и др. (2016); Лю Х. и др. (2024); Ли П. и др. (2025); Ким В.К. и др. (2022). Поиск продолжается: альтернативные корма — перьевая и мясокостная мука — рассматривают как способ повысить доступность аминокислот и точно скорректировать их высвобождающийся профиль кристаллическими аминокислотами. Однако работ, где такая технология оценивалась бы одновременно по продуктивным показателям, экономической целесообразности (Козинец А.И. и др., 2024) и снижению экологической нагрузки через уменьшение экскреции азота (Shnyder J.F. и др., 2023; Kebreab E. и др., 2016), недостаточно. Практически отсутствуют исследования, в которых был бы пройден полный цикл: валидация методов оценки протеаз *in vitro* и изучение их воздействия на переваримость сырья (Bryan D.D.S.L. и др., 2020; Cowieson A.J. и др., 2020), физиологический опыт на птице, производственная проверка и расчет экономико-экологической эффективности.

Цели и задачи исследования. Целью работы являлась разработка эффективной технологии кормления бройлеров на основе низкопротеиновых рационов с включением перьевой муки и кукурузного глютенa, балансируемых кристаллическими аминокислотами и комплексом протеаз для повышения продуктивности, экономической и экологической эффективности производства.

В этой связи в задачи исследований входит:

1. Провести сравнительную валидацию и верификацию методов оценки протеолитической активности ферментных препаратов от разных производителей *in vitro*.
2. Определить влияние комплекса протеаз на переваримость сухого вещества и сырого протеина мясокостной и перьевой муки в условиях *in vitro* моделирования.
3. Установить оптимальный уровень включения протеаз в низкопротеиновые рационы бройлеров, содержащие мясокостную муку, по показателям продуктивности и усвояемости питательных веществ *in vivo*.

4. Разработать подходы к балансированию низкопротеиновых растительных рационов с включением кукурузного глютена с протеазами и по аминокислотному составу и оценить их влияние на рост, конверсию корма и качество туши бройлеров.

5. Дать комплексную оценку практического потенциала совместного применения оптимизированных уровней протеаз, и аминокислот в низкопротеиновых рационах с перьевой мукой на продуктивные показатели и физиологический статус птицы.

6. Определить экологическую и экономическую эффективность предложенной стратегии кормления.

7. Провести производственную проверку разработанной рецептуры комбикорма в условиях промышленного птицеводческого предприятия.

Научная новизна. Впервые разработаны и валидированы усовершенствованные протоколы определения протеазной активности, специфически адаптированные к анализу ферментных препаратов, премиксов и готовых комбикормов. Впервые адаптирован и валидирован двухэтапный метод *in vitro* для оценки истинной переваримости сырого протеина и сухого вещества мясокостной и, что особенно значимо, перьевой муки, как трудноусвояемого субстрата. Впервые на модели низкопротеиновых рационов с включением перьевой муки научно обоснован и экспериментально доказан синергетический эффект от сочетанного применения комплекса экзогенных протеаз и прецизионной балансировки кристаллическими аминокислотами. Впервые установлено, что ключевым механизмом действия протеаз является дозозависимая стимуляция активности эндогенных ферментов полостного и пристеночного пищеварения в тонком кишечнике бройлеров. Впервые доказана не только продуктивная, но и значимая экологическая эффективность данной технологии, выражающаяся в снижении экскреции общего азота с пометом, что способствует снижению эвтрофикации водоёмов биогенными (N,P) элементами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы состоит в углублении и расширении научных представлений в области нутрициологии сельскохозяйственной птицы. Мы предлагаем валидированные и усовершенствованные протоколы оценки *in vitro* протеолитической активности ферментов и переваримости трудноусвояемых кормовых белков — это повышает точность и воспроизводимость экспериментов. Получены новые данные о взаимодействии экзогенных протеаз и кристаллических аминокислот; это взаимодействие раскрывает физиологическую основу усиления полостного и пристеночного пищеварения у птиц. Разработана и экспериментально подтверждена концепция прецизионного балансирования низкопротеиновых рационов с включением альтернативных белковых источников. Она дополняет теорию аминокислотного питания и метаболизма азота. Результаты создают теоретическую базу для ресурсосберегающих и экологически ориентированных технологий кормления, отвечающих принципам экономики замкнутого цикла.

Практическая значимость связана с прямой возможностью внедрения результатов в промышленное бройлерное птицеводство. Разработанные рецептуры комбикормов со сниженным уровнем сырого протеина, сбалансированные кристаллическими аминокислотами и комплексом протеаз, позволяют сократить долю дорогостоящего соевого шрота до 27 % за счет перьевой муки и кукурузного глютена. Это дает прямую экономию на себестоимости кормов, повышает продуктивность на 5–9 %, улучшает затраты корма до 1,46–1,59 кг/кг и увеличивает выход мяса с единицы площади. Апробированные аналитические методики можно внедрить в систему производственного контроля качества сырья и ферментных препаратов на комбикормовых заводах. Важнейший практический итог — доказанная экологическая эффективность технологии: выделение азота с помётом снижается более чем на 10 %, что уменьшает нагрузку на окружающую среду и соответствует жестким экологическим стандартам.

Методология и методы исследования. Объектом исследований были цыплята-бройлеры кросса «Росс 308». В основе работы лежит системный подход: мы объединили анализ научных данных ведущих специалистов по кормлению и биохимии сельскохозяйственной птицы (Егоров И.А., Андрианова Е.Н. и др.) с комплексом классических и современных экспериментальных методов, а также с обобщением и сравнительным анализом полученных результатов. В ходе работы применялись взаимодополняющие группы методов это зоотехнические и производственные: постановка опытов, учёт продуктивности, балансовые испытания. Кроме того, проводили физиологические и морфологические: контрольный убой, анатомическая разделка, отбор биологических образцов. Биохимические и аналитические: определение активности ферментов, биохимический анализ крови, оценка состава кормов. статистические методы обработки данных. Экспериментальную работу выполняли на оборудовании производственной базы АО «Куриное царство», в лабораториях кафедры кормления животных РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева и в аккредитованном испытательном центре ООО НИЦ «Черкизово», а также на лабораторной базе ФГБОУ ВО Волгоградский ГАУ. Это гарантировало высокую точность и достоверность данных.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Разработанные и валидированные методики определения активности кислых, нейтральных и щелочных протеаз в кормовых матрицах, а также оценки *in vitro* переваримости белков трудногидролизуемого сырья: мясокостной и перьевой муки.
2. Научно обоснованная стратегия балансирования низкопротеиновых рационов для бройлеров, включающая снижение уровня сырого протеина на 1,5--2,5 % и его прецизионную компенсацию кристаллическими аминокислотами (лизин, метионин, треонин, валин и изолейцин).

3. Установленный синергетический эффект от комплексного применения экзогенных протеаз и кристаллических аминокислот, обеспечивающий максимальный рост продуктивности.

4. Выявленный дозозависимый характер влияния комбинированных протеаз на продуктивные показатели бройлеров, с определением эффективного диапазона дозировок от 500 до 1000 г/т корма.

5. Установленный физиологический механизм действия протеаз, заключающийся в дозозависимой стимуляции активности эндогенных ферментов полостного и пристеночного пищеварения в тонком кишечнике.

6. Доказанное положительное влияние разработанных рационов на мясные качества туши, выражающееся в достоверном увеличении абсолютной массы грудной и бедренной мышц.

7. Подтверждённая физиологическая безопасность и адаптивность метаболических процессов у бройлеров при использовании низкопротеиновых рационов, сбалансированных аминокислотами и протеазами.

8. Установленная высокая экологическая эффективность технологии, проявляющаяся в снижении экскреции общего азота с помётом на 10,8% и аммонийного азота на 3,8% за счёт увеличения ретенции азота организмом на 6,43 процентных пункта или 10%, а также эффективности его использования до 69,40% что выше на 3% от контроля. Снижение концентрации азотистых соединений в помете подтверждает высокую экологическую эффективность стратегии.

9. Результаты производственной апробации, подтверждающие комплексное улучшение технико-экономических показателей: увеличение выхода мяса с единицы площади на 4,8%, живой массы на 5,2% и сохранности поголовья до 97,9%.

10. Практические рекомендации по составу комбикормов, включающие использование до 6% перьевой муки, премикса кристаллических

аминокислот и комбинации протеаз в дозе 500-1000 г/т, обеспечивающие экономию кормовых ресурсов и снижение себестоимости продукции.

Степень достоверности и апробация результатов исследований.

Достоверность научных результатов и выводов диссертации обеспечена корректной методологией исследований, применением общепринятых и современных аналитических методик, а также репрезентативностью экспериментальных данных, полученных на значительном фактическом материале. Статистическая обработка цифровых данных выполнялась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Апробация работы. Основные положения и результаты исследований диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 150-летию со дня рождения А.Я. Миловича (Москва, 3-5 июня 2024 г.), Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 160-летию Тимирязевской академии (Москва, 2-4 июня 2025 г.), VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука в обеспечении продовольственной безопасности и развитии сельских территорий» (Луганск, 9-10 февраля 2026 г.), XVIII Международной конференции «Инновационные процессы в АПК», секция «Науки о животных» (Москва, 24 апреля 2026 г.), Всероссийской с международным участием научной конференции молодых ученых и специалистов, посвящённой 155-летию со дня рождения академика М.Ф. Иванова (Москва, 27-29 апреля 2026 г.).

Реализация результатов исследований. Полученные в ходе работы научно-практические результаты внедрены в производственную деятельность АО «Куриное царство» (ПАО «Черкизово»).

Публикации результатов исследований. На основании полученных данных диссертационной работы опубликовано 13 работ, из которых 4 – в изданиях, включенных в Перечень ведущих рецензируемых научных

журналов, утвержденных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 154 страницах машинописного текста и включает в себя необходимые разделы (введение, обзор литературы, материал и методы исследований, результаты собственных исследований и их обсуждение, заключение, предложения производству, перспективы дальнейшего исследования и список использованной литературы, список сокращений). Список литературы состоит из 173 источников, в том числе 81 из них иностранных. Работа иллюстрирована 44 таблицами и 1 рисунком.

1. Обзор литературы

1.1 Современные аспекты и тенденции применения кормовых протеаз в России и за рубежом в кормлении животных

Известно (Liu et al., 2024), что кормовые протеазы (КП) представляют собой экзогенные ферментные продукты преимущественно микробного и грибкового происхождения (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae* и др.), которые катализируют гидролиз пептидных связей в белках корма. В результате этого процесса высвобождаются свободные аминокислоты и биологически активные пептиды, что значительно повышает питательную ценность кормов. Особую важность применение протеаз приобретает в кормлении моногастричных животных (птицы, свиней), чья эндогенная протеолитическая активность зачастую недостаточна для полного расщепления растительных белков [1].

Современные исследования (Cowieson, et al., 2020) выделяют несколько ключевых функций кормовых протеаз в животноводстве: оптимизация аминокислотного питания – ферменты способствуют повышению доступности критически важных аминокислот (лизина, метионина, треонина), которые часто являются лимитирующими факторами роста и продуктивности животных [2]; инактивация антипитательных веществ протеазы эффективно разрушают ингибиторы трипсина и другие антипитательные факторы, содержащиеся в растительных кормах (особенно в соевом шроте), что улучшает переваримость протеина; физиологическое воздействие на пищеварение – некоторые бактериальные протеазы способны снижать вязкость кишечного содержимого, улучшая процессы переваривания и всасывания питательных веществ (Liu et al., 2022) [3].

Было выявлено, что в мировой практике кормовые протеазы нашли широкое применение в птицеводстве и свиноводстве. Лидерами в разработке и производстве этих ферментов являются компании *Novozymes* (Дания), *DSM* (Нидерланды), *AB Vista* (Великобритания).

В России данный сегмент рынка пока развит недостаточно, однако в последние годы наблюдается активный рост интереса к этим технологиям как со стороны научного сообщества, так и со стороны производителей кормовых добавок, в работах (Молоканова О.В. и Шацких Е.В., 2019) выделяются следующие тенденции применения протеаз: экономическая эффективность—использование кормовых протеаз подтверждается многочисленными исследованиями, демонстрирующими их способность снижать затраты на кормление при сохранении или повышении продуктивности животных и птицы. Ключевым преимуществом является возможность частичной замены высокобелковых ингредиентов (таких как соевый шрот) без ущерба для продуктивности [4].

Исследования (Нао et al., 2025) показали, что включение протеаз в низкопротеиновые рационы бройлеров улучшает переваримость аминокислот и морфологию кишечника, что позволяет эффективно использовать сниженный уровень сырого протеина без потери продуктивности [5].

В работе (Козинец А.И. 2024) было отмечено, что в Бразилии, являющейся крупнейшим мировым производителем сои, кормовые протеазы стали важным инструментом оптимизации себестоимости комбикормов. естные птицеводческие предприятия активно внедряют ферментные добавки. Что делает их менее зависимы от колебаний цен на соевые продукты [6].

Метаанализ Zuo и соавторов (2020), охвативший 27 исследований по кормлению свиней на откорме, подтверждает эффективность протеаз. Авторы обнаружили устойчивое улучшение конверсии корма (FCR) на 3–7 % при введении ферментов в рационы. Причина — более полное усвоение аминокислот и снижение потерь азота [7].

Экономическая выгода от кормовых протеаз не сводится к прямой экономии на дорогих белковых компонентах. Она включает и улучшение общих показателей эффективности кормления, поэтому протеазы считаются перспективным инструментом для современного животноводства и птицеводства.

Экологический аспект также заслуживает внимания. По данным Kebreab E. (2016), применение протеаз при кормлении животных дает значительные экологические выгоды — прежде всего снижение нагрузки на окружающую среду за счет меньшего выведения азота через экскременты. Потери азота удастся уменьшить на 15–25 %: белковые вещества из рациона усваиваются эффективнее. Особенно актуально это для стран ЕС с их жесткими экологическими требованиями (директива IPPC 2017/52 о промышленных выбросах) [8].

Показателен опыт Дании, описанный Shnyder и соавторами (2023). Там протеазы включили в 90 % комбикормов для свиней. За пять лет это сократило выбросы аммиака (NH_3) на 18 %. Такие результаты говорят о значительном потенциале протеаз в решении экологических проблем современного животноводства [9].

Среди новых высокоэффективных форм кормовых протеаз (Li et al., 2025) интерес представляют термостойкие протеазы генномодифицированного штамма *Thermoascus aurantiacus*. Их активность сохраняется в диапазоне 90–95 °С, что позволяет применять такие ферменты при грануляции корма [10]. Бочкарев А.К., Анашкина И.И., Кравцова Е.В. (2023) видят перспективу в комплексных препаратах ферментов. Пример — ProAct 360 (DSM): он объединяет протеазы с фитазами и дает синергетический эффект. По данным авторов, сочетание увеличивает усвоение фосфора еще на 10 % помимо положительного влияния на белковый обмен. Такие решения открывают новые возможности для оптимизации кормления сельскохозяйственных животных [11–12].

В России исследования Капитоновой Е.А. и Чирвинского А.Ю. (2020) и практическое применение кормовых протеаз развиваются успешно, хотя и сталкиваются с ограничениями. Отечественные разработки подтверждают эффективность добавок. Протеаза «Биопроtein-М» («Биотроф») в кормлении кур-несушек увеличила яйценоскость на 5,8 % и одновременно снизила расход

корма на 7 г на одно яйцо. Испытания на свиньях показали снижение себестоимости роста на 12 % [13].

Однако внедрение протеаз в российское животноводство тормозят существенные трудности. Главные проблемы — ограниченный ассортимент (14 зарегистрированных препаратов против более 40 в ЕС, по данным Россельхознадзора за 2023 г.), скептицизм производителей (по опросу 300 птицефабрик (Шаабан М., 2023) лишь 23 % регулярно используют протеазы) [14], недостаток данных об эффективности на местных породах (например, кросс «Смена-9») и высокая стоимость импортных препаратов — на 30 % дороже аналогов. Государство принимает меры для решения этих проблем. Показано (Зинина О.В. и др., 2023), что ферментативный гидролиз белков не только повышает их усвояемость, но и позволяет получать гидролизаты, богатые биоактивными пептидами, которые находят применение как в кормлении, так и в пищевой промышленности [15]. С 2025 года планируется включить ферментные добавки в список субсидируемых компонентов (проект Минсельхоза № 445-р). Кроме того, ведутся активные работы по импортозамещению – в *НИИ Биотехнологии* (г. Пущино) разработан отечественный штамм *Bacillus licheniformis* (Борисовец Д.С., 2020), превосходящий зарубежные аналоги по активности на 20%. Эти меры создают предпосылки для более широкого внедрения протеаз в российское животноводство [16].

Сравнительный анализ кормовых протеаз мировых производителей согласно исследованиям (Li, et al 2025., Fernandes 2024., Duan et al 2021., Srimathi 2024.), в современных условиях интенсивного животноводства применение кормовых протеаз приобретает особую значимость. Для систематизации данных о существующих на рынке ферментных препаратах ниже представлен сравнительный анализ продукции ведущих мировых производителей (таблица 1.1.1)

Таблица 1.1. Сравнительная характеристика кормовых протеаз мировых производителей:

Производитель	Страна	Продукт	Тип	pH	Терм. стаб.
Novozymes	Дания	Ronozyme® ProAct	Bacillus licheniformis	3,0-9,0	До 90°C
DSM	Нидерланды	HiPhorius™	Грибковая	4,0-7,5	До 85°C
VTR Bio-Tech	Китай	VPRO®	Bacillus licheniformis	3,0-9,0	До 85°C
Novus	США	CIBENZA® DP100	Bacillus licheniformis	3,5-8,0	До 90°C
AB Vista	УК	Quantum® Blue	Комплексная	3,5-8,0	До 80°C
Adisseo	Франция	ProAct 360™	Бактериальная	4,0-8,0	До 75°C
Guangdong VTR Bio-Tech	Китай	VTR ProAct	Bacillus subtilis	3,0-8,0	До 85°C
IFF	США	Enzyvia® ProTec	B. subtilis	3,5-8,5	До 85°C
Kemin	США	Versazyme®	Мультиэнзим	4,5-7,0	До 70°C
Sunhy Biology	Китай	Sunhy Protease	Грибковая	4,0-7,5	До 80°C
CJ Bio	Ю. Корея	ProteUp™	B. amyloliquefaciens	4,0-8,5	До 88°C
Longda Bio-products	Китай	LD-Protease Plus	Bacillus subtilis	3,5-8,0	До 75°C
Advanced Enzymes	Индия	ProFeed®	B. subtilis	3,5-8,5	До 82°C
Daesang	Ю. Корея	Enzicoat Pro	Микробная	3,5-8,0	До 85°C
Jinan TTX	Китай	TTX Protease	Комплексная	4,0-8,0	До 70°C
Zhejiang Aegis Bio-tech	Китай	Aegis Prozyme	Комбинированная	4,0-8,0	До 80°C
Maple Biotech	Индия	Maprozyme Pro	B. licheniformis	3,0-8,5	До 80°C
Beijing Smistyle Sci. & Tech.	Китай	SmiProtease	Bacillus licheniformis	3,5-8,5	До 83°C
Biorigin	Бразилия	Bio Protease	Грибковая	4,0-7,0	До 80°C
Youtell Biochemical	Китай	Youtell Protease	Bacillus amyloliquefaciens	4,5-8,5	До 82°C
Hunan Lerkam Biological	Китай	Lerkam Protease	Грибковая	3,5-7,5	До 78°C
Shanghai Worthy Chemicals	Китай	WorthyPro	Бактериальная	4,0-7,5	До 77°C
Lonct Enzymes	Китай	Lonctase® Pro	Bacillus subtilis	3,5-8,5	До 85°C

1.2 Особенности лабораторного анализа протеаз и оценки их активности

Лабораторный анализ протеолитической активности ферментов представляет собой сложный многоаспектный процесс, требующий комплексного подхода. В работах (Zhang et al., 2024; Srimathi 2024) показано, что ключевыми факторами, которые необходимо учитывать при проведении исследований, являются: биологическое происхождение ферментов: бактериальные протеазы (например, из *Bacillus spp.*); грибковые (из *Aspergillus spp.*); субстратная специфичность (предпочтение к определенным типам белков, включая казеин, глютен и соевые белки). Показано, что оптимальные условия проведения анализа есть: диапазон pH 3,0-9,0 (в зависимости от типа фермента); температурный режим 25-95°C; возможные матричные эффекты, а современная аналитическая практика предлагает широкий спектр методов для оценки протеазной активности, включая спектрофотометрические, флуориметрические и электрофоретические подходы [21]. Как выявлено в исследованиях (Srimathi, Virivinti 2024; Zhang et al 2024), выбор конкретной методики должен основываться на: четком понимании целей исследования; требуемом уровне точности; доступном лабораторном оборудовании [20-21].

Спектрофотометрические методы занимают центральное место в анализе протеаз благодаря своей простоте, воспроизводимости и доступности. Азоказеиновый метод [22-23] (Eswayah et al., 2023; Fornazier et al., 2024), применяемый для анализа нейтральных и щелочных протеаз, основан на: использовании высокоочищенных коммерческих субстратов; стандартизированных буферных системах; автоматизированном детектировании. Для анализа специфических протеаз (трипсина, химотрипсина) широко применяется метод с флуорогенными пептидными субстратами (например, AMC-мечеными), обеспечивающий высокую чувствительность (Zavelinski et al., 2024; Peñuela-Sierra et al., 2024) [24-25].

Метод с гемоглобином (HUT) является стандартным подходом для определения активности кислых протеаз, однако современные протоколы (Sun

et al., 2024 и Oluwabiye & Song, 2024) включают использование рекомбинантных субстратов и автоматизированных платформ для минимизации погрешности [26-27]. Метод применяется преимущественно для грибковых протеаз; основан на гидролизе гемоглобина в кислой среде (pH 2.0); включает определение высвобожденных тирозинсодержащих пептидов. Методика соответствует стандарту AOCS Official Method Ja 8-21 (2022). Современные подходы используют калибровочные кривые по стандартным пептидам и автоматический расчет активности.

Методы с использованием электрофореза (SDS-PAGE) представлены в таблице 1.2.1. Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) до сих пор широко применяется. Riddell и соавторы (2022) описали его современные варианты: флуоресцентное окрашивание, капиллярный электрофорез и иммуноблоттинг с моноклональными антителами [28].

Таблица 1.2.1- Ключевые параметры метода электрофореза

Параметр	Оптимальные условия	Критичность
Концентрация акриламида	12% для белков 10-100 кДа	Высокая
pH буфера	8,3 ± 0,2	Высокая
Температура	4°C (холодный режим)	Средняя
Время электрофореза	До фронта красителя	Высокая

SDS-PAGE часто используют для анализа протеолитической активности разных ферментов. Как показывают работы [29-33] (Guan et al., 2017; Peres et al., 2024; Du F et al., 2020; Ryu S et al., 2021; Garcia F et al., 2014), для каждого типа протеаз нужны свои условия. Для бактериальных протеаз основной субстрат это казеин, при этом нужно контролировать концентрацию ионов Ca²⁺ (2-5 mM), которые влияют на активность ферментов. Для грибковых протеаз, особенно металлопротеаз, добавляют EDTA (1-2 mM) для хелатирования металлов, а анализ ведут в слабокислом диапазоне pH (4,0-5,0), который соответствует их оптимуму активности. Для термостабильных

ферментов проводят предварительную инкубацию при 85 °С в течение 5 минут для активации, а для предотвращения денатурации добавляют стабилизаторы, например 10 % глицерина.

В исследованиях протеолиза SDS-PAGE применяют по-разному (Zhao Y et al., 2022; Rani S., 2021; Du F 2020; Kandasamy S., 2021; García-Carreño, Hernández-Cortés., 2014) [34-38]. При анализе гидролиза соевого белка визуализируют исчезновение полосы 75 кДа (β-конглицинин) и обнаруживают низкомолекулярные пептиды (<20 кДа) как показатель степени деградации. Для контроля качества ферментных препаратов этот метод позволяет детектировать протеолитические примеси.

Титровальные методы основаны на непрерывном измерении количества кислоты или щелочи, которое нужно для поддержания постоянного pH. Они особенно эффективны для анализа pH-зависимых протеаз (Bénard & Gibon, 2016; Mhamadi et al., 2016; Sarin & Mishra, 2004; Mishounin & Borodinskaia, 1978; Ong & Yang., 2017; Nadar et al., 2017) [39-44]. Оптимальные условия для разных протеаз такие: пепсин работает при pH 2,0-3,5, папаин при pH 6,0-7,0. Стандартный протокол включает несколько пунктов. Используют автоматический титратор с pH-статом. Температуру поддерживают с точностью ±0,1 °С. Скорость перемешивания составляет 200-300 об/мин. Реакционная смесь это 1 % растворы казеина или гемоглобина в 10 мл буфера (ионная сила 0,1 М NaCl). Фермент вводят в количестве 0,1-1,0 мг. Затем регистрируют расход 0,01 М HCl или NaOH для поддержания заданного pH.

Активность фермента определяют по формуле:

$$\text{Активность (Ед/мл)} = \frac{V \times c \times D}{t \times V}$$

Здесь V это объем израсходованного титранта (мл), c это концентрация титранта (моль/л), D это коэффициент разведения образца, t это время реакции (мин), V это объем фермента в реакционной смеси (мл).

Титровальный метод анализа протеазной активности (AOAC Official Method 2019.08) дает точность около ± 2 %. Он позволяет прослеживать ход реакции и автоматизировать процесс. Правда, для этого требуется специальный прибор, а результат может сдвигаться из-за ионной силы раствора и углекислого газа из воздуха. В современных версиях метода перешли на микрометоды с объемом 1 мл, работу с рН-статом и мультиканальные системы. Это открывает путь к стандартизации ферментных препаратов, изучению кинетики и контролю стабильности при хранении. Ограничения связаны с постепенной деградацией субстратов (0,1–0,5 % потери активности в месяц) и высокой стоимостью оборудования. Чтобы удержать точность, нужны регулярная калибровка по стандартным образцам, контроль ионной силы и минимизация контакта с CO₂.

Таблица 1.2.2.- Сравнение с другими методами анализа протеазной активности

Параметр	Титрование	Спектрофотометрия	Флуориметрия
Чувствительность	0,01 U	0,1 U	0,001 U
Временное разрешение	1 сек	10 сек	0,1 сек
Влияние мутности	Нет	Сильное	Среднее
Стоимость анализа	Высокая	Низкая	Средняя

Анализ протеаз в последние годы развивается в сторону миниатюризации (Ong et al., 2017; Nadar et al., 2017; Ortiz et al., 2026; Pokrzywa et al., 2019; Lessinger et al., 1998). Заметное место здесь занимают микрофлюидные технологии. Они позволяют работать с ультрамалыми объемами (10-100 мкл) и сокращают время исследования до менее 5 минут. Параллельно появляются комбинированные сенсорные системы. В них одновременно измеряют рН и проводимость, что даёт мультипараметрический контроль протеолитического процесса в режиме реального времени. Ещё одно направление связано с внедрением искусственного интеллекта в анализ и

оптимизацию протеолиза. ИИ-алгоритмы прогнозируют оптимальные условия реакции и автоматически корректируют параметры прямо во время эксперимента [44-48].

Такие подходы открывают путь к полностью автоматизированным аналитическим платформам. Анализ протеаз может стать быстрее, точнее и доступнее. Правда, для этого нужно решить несколько технических задач: миниатюризировать оборудование и разработать надёжные алгоритмы машинного обучения [49-54].

Таблица 1.2.3. - Разнообразие единиц измерения активности протеазы разных производителей

Единица	Определение	Пример применения	Пересчет
Anson (AU)	1 мкмоль Туг/мин при 25°C, pH 7,5	Бак. протеазы (Novozymes)	1 AU = 0,48 U (FIP)
HUT	1 мкмоль Туг/мин при 40°C, pH 4,7	Гриб. протеазы (DSM HiPhorius™)	1 HUT = 1,2 AU
FIP (U)	1 мкмоль/мин субстрата (BAPNA)	Фармакопейные стандарты	1 U = 2,08 AU
USP	Гидролиз бензоил-аргинин-этилового эфира	Медицинские препараты	1 USP = 1,5 AU

Определение протеазной активности редко дает сопоставимые результаты, если субстраты различаются: азоказеин и гемоглобин могут приводить к расхождению. Дополнительный источник ошибки — термостабильные протеазы, активность которых приходится корректировать с учетом температуры гранулирования (85–95 °C). Отсюда следует необходимость стандартизации. Солопченко Г.Н. (2016) и Zhang et al. (2021) называют опору на метрологию со стандартными образцами (NIST, BCR), унифицированные протоколы (AOAC, ГОСТ, ISO) и статистический контроль погрешностей ($CV < 5\%$). В новых методиках для согласования данных применяют алгоритмы искусственного интеллекта, а для снижения ошибок — микрожидкостные системы [55–56].

Точность анализа во многом держится на референсных материалах. Wise et al. (2022) и Lemke et al. (2022) описывают три типа стандартов:

первичные (например, NIST SRM 927e), вторичные (коммерческие препараты) и субстратные (азоказеин, гемоглобин). Для них нормируют активность с погрешностью $\leq 2\%$ и стабильность при хранении. NIST SRM 927e (бычий трипсин) — международно признанный первичный стандарт; его чистота $> 99\%$, активность аттестована, условия хранения оптимизированы. Промышленный вторичный стандарт протеазы *Bacillus licheniformis* калибруют по первичным стандартам, что дает сочетание стабильности и доступной стоимости [57–58].

Валидация методик представляет собой жестко заданную последовательность процедур. Wei et al. (2023) выделяют три основных параметра: точность (отклонение $\leq 5\%$), линейность ($R^2 > 0,995$) и пределы обнаружения (0,01–100 U/mL). Валидация включает калибровку оборудования и оценку матричных эффектов. Отдельно проверяют воспроизводимость в межлабораторных испытаниях по AOAC: CV не выше 5 % и не менее 8 аккредитованных лабораторий [59].

Thompson et al. (2002) показали, что для учета матричных эффектов при определении протеолитической активности в пробу вводят интерферирующие вещества в физиологически значимых концентрациях. Калибровка оборудования охватывает проверку спектрофотометров по стандартным растворам, pH-метров — по буферным растворам, термостатов — по эталонному термометру. При вводе нового оборудования калибровку проводят в первую очередь [60].

Лабораторный анализ протеолитической активности — многоаспектная задача. Она зависит от биологического происхождения ферментов, субстратной специфичности, условий анализа и матричных эффектов. Аналитическая практика располагает спектрофотометрическими методами (азоказеиновый, с BAPNA), методом с гемоглобином (HUT), электрофорезом (SDS-PAGE) и титровальными методами. Выбор между ними определяется целью анализа и свойствами образца.

Таблица 1.2.4. – Разные протеазные единицы (Protease Units)

Производитель	Ключевой продукт	Тип протеазы	pH	Ед.
Активность (PROT/g)				
Novozymes	Ronozyme® ProAct	B. licheniformis	3,0-9,0	15,000
Adisseo	ProAct 360™	Бактериальная	4,0-8,0	9,500
Beijing Smistyle Sci. & Tech.	SmiProtease	B. licheniformis	3,5-8,5	11,200
Lonct Enzymes	Lonctase® Pro	Bacillus subtilis	3,5-8,5	12,000
HUT - единицы гемоглобина по тирозиновой основе (Hemoglobin Unit Tyrosine basis) (HUT/g)				
DSM	HiPhorius™	Грибковая	4,0-7,5	10,000
Kemin	Versazyme®	Мультиэнзим	4,5-7,0	7,500
Sunhy Biology	Sunhy Protease	Грибковая	4,0-7,5	9,000
Biorigin	Bio Protease	Грибковая	4,0-7,0	10,000
Hunan Lerkam Biological	Lerkam Protease	Грибковая	3,5-7,5	8,700
AU - ансоновские единицы (Anson Units) (AU/g)				
Novus	CIBENZA® DP100	B. licheniformis	3,5-8,0	14,000
IFF	Enzyvia® ProTec	B. subtilis	3,5-8,5	13,000
CJ Bio	ProteUp™	B. amyloliquefaciens	4,0-8,5	16,000
Advanced Enzymes	ProFeed®	B. subtilis	3,5-8,5	10,500
Daesang	Enzicoat Pro	Микробная	3,5-8,0	12,500
Maple Biotech	Maprozyme Pro	B. licheniformis	3,0-8,5	9,800
Youtell Biochemical	Youtell Protease	B. amyloliquefaciens	4,5-8,5	9,500
PU - протеазные единицы (Protease Units) (PU/g)				
AB Vista	Quantum® Blue	Комплексная	3,5-8,0	8,000
Jinan TTX	TTX Protease	Комплексная	4,0-8,0	7,000

Спектрофотометрия привлекает простотой и воспроизводимостью. HUT-метод дает физиологически релевантную оценку. SDS-PAGE раскрывает весь спектр продуктов гидролиза. Титровальные методы обеспечивают высокую точность (табл. 1.2.4). У каждого есть ограничения: чувствительность к условиям анализа, временные затраты, необходимость специализированного оборудования либо полуколичественный характер результатов. В анализе протеаз это выводит на первый план стандартизацию — референсные материалы (первичные, вторичные и субстратные стандарты), унифицированные протоколы и статистический контроль качества. Достоверность данных достигается валидацией методов, межлабораторными испытаниями, учетом матричных эффектов и регулярной калибровкой приборов.

Развитие анализа протеаз связано с микрофлюидными технологиями, комбинированными сенсорными системами и искусственным интеллектом. Такое сочетание открывает путь к полностью автоматизированным аналитическим платформам. Для широкого внедрения предстоит миниатюризировать оборудование, повысить стабильность сенсоров и разработать надежные алгоритмы машинного обучения. В целом методы анализа протеаз продолжают развиваться в сторону большей точности, скорости и доступности, при этом сохраняется высокая степень стандартизации и контроля качества.

1.3 Физико-химические свойства кормового протеина как субстрата для протеолитических ферментов

Кормовые белки — это сложные биополимеры. Они служат основным субстратом для протеолитических ферментов в пищеварительном тракте животных. Как показано в работах (Tavano O.L et al., 2018; Day et al., 2022), их физико-химические свойства в значительной степени определяют эффективность ферментативного гидролиза и последующую усвояемость питательных веществ. В кормовой промышленности преимущественно используются белки растительного (соевый шрот, рапсовый жмых, подсолнечный шрот) и животного (рыбная мука, мясокостная мука) происхождения, каждый из которых обладает уникальными структурными и функциональными характеристиками [61-62]. Молекулярная организация кормовых протеинов включает несколько уровней структурной организации. В исследованиях (Loveday S.M, 2020, Brodtkorb A, 2019, Nishinari K, 2014) было установлено, что первичная структура представлена специфическими последовательностями аминокислот, причем растительные белки обычно содержат больше глутамина, пролина и аргинина, тогда как животные белки богаче лизином и метионином. Вторичная структура характеризуется содержанием α -спиралей (10-30%) и β -слоев (30-50%), которые создают стерические препятствия для доступа ферментов. Дисульфидные мостики, ионные взаимодействия и гидрофобные контакты удерживают третичную и

четвертичную структуры белков [63–65]. Растворимость белка, от которой напрямую зависит эффективность ферментативного гидролиза, меняется с pH (Du M., Xie J., 2018; Tanger C., Engel J., 2020). Минимум растворимости приходится на изоэлектрическую точку: pH 4,5–5,5 для растительных белков и 5,0–6,5 для животных. Здесь суммарный заряд молекулы равен нулю, и белки склонны к агрегации. При сдвиге pH от pI растворимость растет и достигает максимума в щелочной зоне (pH 8,0–9,0). Причина — депротонирование карбоксильных групп и рост суммарного отрицательного заряда молекул [66–67].

Гидрофобность белка (40–120 кДж/моль) — еще один фактор, определяющий взаимодействие с протеазами (Meng, Li, 2021). В нативной глобуле гидрофобные участки скрыты внутри; фермент получает к ним доступ лишь после частичной денатурации. От этого зависит доступность пептидных связей для эндопептидаз и термодинамика процесса [68]. Для промышленной переработки кормов денатурационные характеристики кормовых белков приобретают особое значение. Qi P.X. и Onwulata C.I. (2011) показали: температура денатурации растительных белков составляет 60–85 °С, животных — 45–70 °С, энтальпия процесса — 5–15 Дж/г белка. В производстве кормов белки проходят интенсивную термомеханическую обработку — гранулирование при 80–95 °С, экструзию. Структура при этом заметно меняется: нативная спиральность падает на 30–60%, образуются новые дисульфидные связи, идут реакции Майяра, затрагивающие до 15% остатков лизина [69]. Эти структурные (Jingwang C. et al, 2018) изменения имеют двоякий эффект: с одной стороны, они повышают доступность белков для экзопептидаз за счет частичного разворачивания молекул, с другой - могут снижать эффективность эндопептидаз из-за образования новых устойчивых структур и межмолекулярных сшивок. Поэтому состав ферментных композиций нужно подбирать тщательно, а условия их применения оптимизировать [70].

Есть несколько критических факторов, которые влияют на эффективность гидролиза кормовых белков. Первый это оптимальное соотношение гидрофобных и полярных аминокислот (1:2-1:3). Вторым фактором — присутствие природных ингибиторов протеаз. В соевых продуктах их содержание достигает 0,1–3 мг/г в пересчете на трипсиновые ингибиторы. Третий — ионный состав среды: Ca^{2+} способен повышать стабильность металлопротеаз. Четвертый — степень предварительной термической обработки белка. Пятый — сопутствующие вещества: полисахариды, липиды, фенольные соединения. В кормовой промышленности развиваются методы прекодиционирующей обработки белков (Chemat F., 2018; Sari Y.W. et al., 2015). К ним относят направленную ферментативную модификацию, ультразвуковую обработку и контролируемые pH-сдвиги [71–72]. Potenza L. с соавторами (2024) и Wang Y. с соавторами (2012) показали, что такие приемы увеличивают биодоступность кормового протеина на 15–40 % за счет оптимизации физико-химических свойств субстрата для последующего ферментативного гидролиза. Отдельное направление — комплексные ферментные системы, объединяющие эндо- и экзопептидазы с разной субстратной специфичностью. Это позволяет полнее использовать питательный потенциал кормовых белков [73–74]. Кормовые протеины растительного и животного происхождения содержат комплекс антипитательных факторов, которые существенно влияют на эффективность протеолиза.

Gilani G.S. (2012) и Acar T. (2015) установили, что наиболее значимы ингибиторы протеаз (до 3-5 % от общего белка в соевых продуктах). Среди них есть термостабильные формы, которые сохраняют активность даже после термической обработки и специфически связываются с активными центрами трипсина и химотрипсина. Таннины, которые присутствуют в зернобобовых, образуют нерасщепляемые комплексы с белками и снижают доступность субстрата на 15-25 %. Лектины не только ингибируют протеазы, но и нарушают функцию кишечных энтероцитов. Поэтому их нужно

предварительно инактивировать ферментативными или термическими методами [75-76]. Особое значение имеют посттрансляционные модификации белков. Одна из них — это гликозилирование, характерное для растительных протеинов. При гликозилировании олигосахаридные цепи создают стерические препятствия для действия протеаз, и тогда нужны гликозидазы в комбинации с протеолитическими ферментами. Другая модификация это фосфорилирование, преимущественно в белках животного происхождения. Оно повышает устойчивость к термоденатурации и увеличивает потребность в металлопротеазах. Современные методы анализа структуры белков (Saundagar.P et al.,2022) включая дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) с точностью определения температур денатурации $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, круговой дихроизм для мониторинга изменений вторичной структуры *in situ* и малую угловую рентгеновскую дифракцию для визуализации агрегатов после термообработки, позволяют прогнозировать степень и скорость гидролиза [77]. Перспективные направления (Nicze M. et al.,2024) модификации белков включают плазменную обработку, увеличивающую поверхностную гидрофильность и снижающую температуру денатурации на $10\text{-}15^{\circ}\text{C}$, ферментативный пре-гидролиз с использованием комбинации эндопротеаз перед термообработкой для уменьшения образования майллардовских продуктов, и наноинкапсуляцию ферментов для защиты от инактивации при гранулировании и контролируемого высвобождения в кишечнике, и практические рекомендации по подбору ферментных композиций предполагают соблюдение оптимального соотношения эндо- и экзопептидаз (3:1 для нативных белков и 1:2 для денатурированных), обеспечение необходимых кофакторов ($0,5\text{-}1,0\text{ mM Ca}^{2+}$ для металлопротеаз и глутатиона для цистеиновых протеаз) и учет pH-профиля активности (кислые протеазы при pH 3,0-4,5 для желудочного переваривания и нейтральные/щелочные при pH 6,5-8,0 для кишечной фазы) [78]. Ndochinwa G. и соавторы (2022) показали, что перечисленные подходы снимают ряд технологических ограничений: образование горьких пептидов,

гелеобразование при глубоком гидролизе, потери серосодержащих аминокислот. В итоге удастся приблизиться к максимально возможной биодоступности белкового компонента кормов [79].

Кормовые белки — сложные биополимеры. Их физико-химические свойства и структурная организация задают эффективность ферментативного гидролиза в пищеварительном тракте животных. Растительные и животные белки заметно расходятся по аминокислотному составу, структурным особенностям и функциональным характеристикам, поэтому переработка требует дифференцированного подхода. Молекула белка организована на нескольких уровнях — первичном, вторичном, третичном и четвертичном. Такая иерархия создает стерические и электростатические препятствия для протеолитических ферментов. Доступность субстрата определяется растворимостью, гидрофобностью и термостабильностью.

Эти параметры варьируют в зависимости от типа белка и условий среды. Современные технологии переработки кормов, включающие термическую обработку и механическое воздействие, приводят к значительным структурным изменениям белков, что оказывает двойное влияние на их переваримость. С одной стороны, денатурация повышает доступность пептидных связей, с другой - может вызывать образование новых устойчивых структур и межмолекулярных сшивок.

Эффективность гидролиза кормовых белков зависит от комплекса факторов, включая: наличие антипитательных веществ (ингибиторы протеаз, таннины, лектины); ионный состав среды и наличие кофакторов; степень предварительной термической обработки; наличие сопутствующих компонентов (полисахариды, липиды); современные тенденции в кормовой промышленности, направлены на разработку инновационных методов обработки белков (ультразвук, плазменная обработка, ферментативный пре-гидролиз) и создание комплексных ферментных систем, что позволяет повысить биодоступность кормового протеина на 15-40%. Перспективными направлениями являются: использование современных аналитических

методов (ДСК, круговой дихроизм); разработка наноинкапсулированных ферментных препаратов; оптимизация состава ферментных композиций с учетом структурных особенностей белков.

Как показано в работе (Ndochinwa G et al., 2022) комплексный подход к переработке кормовых белков, учитывающий их структурные особенности и современные методы модификации, позволяет преодолеть основные технологические ограничения и максимально реализовать питательный потенциал кормов.

1.4 Протеолитическая система желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных птиц.

Протеолитическая система желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных птиц представляет собой сложный многоуровневый комплекс ферментов, адаптированный к анатомо-физиологическим особенностям пищеварения у птиц, в отличие от млекопитающих, процесс переваривания белков у птиц начинается в железистом желудке, где создаются оптимальные условия для активации пепсинов. Пепсиногены, синтезируемые главными клетками слизистой оболочки, подвергаются автокаталитическому превращению в активные пепсины при pH 2,0-3,5. По данным (Финисин В.И. и др., 2025; Bryan et al., 2020), у птиц идентифицировано три изоформы пепсина: пепсин А преимущественно гидролизует пептидные связи с участием ароматических аминокислот, пепсин В проявляет наибольшую активность в отношении связей, образованных лейцином и аланином, а пепсин С эффективно расщепляет пролин-содержащие пептиды. Как показано, оптимальная температура для работы пепсинов составляет 39-42°C, что соответствует нормальной температуре тела птиц [80-81]. В тонком отделе кишечника протеолиз продолжается под действием панкреатических ферментов. Как установлено в работах (Толкачева А.А. 2017; Ловцова Л.Г. 2016; Yang 1989) центральное место в этом процессе занимает трипсин, который активируется из трипсиногена под действием энтерокиназы, у птиц

обнаружены две молекулярные формы трипсина: трипсин-1, устойчивый к ингибиторам соевого шрота, и трипсин-2, чувствительный к ингибиторам типа Кунитца. Химотрипсин птиц характеризуется расширенной субстратной специфичностью по сравнению с млекопитающими, эффективно гидролизует пептидные связи после гидрофобных аминокислот, важной особенностью протеолитической системы птиц является высокая активность карбоксипептидаз А и В, обеспечивающих терминальное расщепление пептидов до свободных аминокислот [82-85]. Заключительные этапы переваривания белков осуществляются мембраносвязанными пептидазами кишечных энтероцитов. Как показано в исследованиях (Ланцева Н.Н. 2017, Нестеренко З.В. 2024) особое значение имеют аланинаминопептидаза и дипептидилпептидаза IV, которые завершают процесс гидролиза. Уникальной особенностью птиц является исключительно высокая активность щелочной фосфатазы, участвующей в транспорте аминокислот и модуляции кишечной микробиоты [86-87]. Регуляция протеолитической системы у птиц осуществляется на нескольких уровнях. Нервная регуляция идёт через блуждающий нерв. Он стимулирует секрецию пепсиногена в желудке. Гуморальная регуляция с участием гастрина и секретина усиливает синтез панкреатических ферментов. Это доказано в работах Вертипрахова В.Г. и др. (2016), Tsutsui et al. (2006), Алейник В.А. и Бабич С.М. (2023), Foltyn et al. (2015), Лунегова А.М. и др. (2022). Локальная регуляция осуществляется продуктами частичного гидролиза белков. Эти продукты стимулируют секрецию энтерокиназы. Состав рациона заметно влияет на активность протеолитической системы. Высокобелковые корма увеличивают активность трипсина. Рационы с повышенным содержанием клетчатки, наоборот, снижают эффективность протеолиза. Ингибиторы протеаз соевого шрота могут подавлять активность трипсина. Поэтому такие корма обязательно нужно обрабатывать перед скармливанием [88-92].

Протеолитическая система желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных птиц представляет собой сложный многоуровневый

комплекс ферментов, адаптированный к анатомо-физиологическим особенностям пищеварения у птиц. Как было отмечено в работах (Налетова Л.А. 2017; Чопорова Н.В. и Шубина Т.А. 2014; Пенджиев А.М. и Абдуллаев А. 2014) в отличие от млекопитающих, процесс переваривания белков у птиц начинается в железистом желудке, где создаются оптимальные условия для активации пепсинов

Таблица 1.4 - Характеристика основных протеолитических ферментов ЖКТ сельскохозяйственных птиц

Фермент	Локализация	pH	Температура оптимум (°C)	Основные субстраты
Пепсин А	Железистый желудок	2,0-3,5	40-42	Фен-Фен, Фен-Тир связи
Трипсин-1	Тонкий кишечник	7,5-8,0	39-41	Арг-Х, Лиз-Х связи
Химотрипсин	Тонкий кишечник	7,8-8,5	38-40	Вал-Х, Лей-Х, Иле-Х связи
Карбоксипептидаза А	Тонкий кишечник	7,0-7,5	37-39	С-концевые ароматические аминокислоты
Аланинаминопептидаза	Энтероциты	6,8-7,2	37-40	Н-концевые аланин-содержащие пептиды

Пепсиногены, синтезируемые главными клетками слизистой оболочки, подвергаются автокаталитическому превращению в активные пепсины при pH 2,0-3,5, у птиц идентифицировано три изоформы пепсина: пепсин А преимущественно гидролизует пептидные связи с участием ароматических аминокислот, пепсин В проявляет наибольшую активность в отношении связей, образованных лейцином и аланином, а пепсин С эффективно расщепляет пролин-содержащие пептиды. Как показано в работах Федорова 2023, оптимальная температура для работы пепсинов составляет 39-42°C, что соответствует нормальной температуре тела птиц [93-95]. Как подчёркивают (Просекова Е.А. и др., 2022; Хамитова В.З. и др., 2021; Дускаев Г.К. и др., 2019; Ковалёва С.А. и Поддубная О.В. 2019; Almonte et al., 2019) желудочное пищеварение птиц имеет ключевые отличия от млекопитающих, обусловленные двухкамерным строением желудка. В проventрикулусе

происходит секреция HCl и пепсиногена, при этом динамика pH характеризуется снижением до 1,5-2,5 после кормления. У цыплят-бройлеров pH стабилизируется к 10-14 дню жизни, достигая значений взрослых птиц. Пепсин А имеет оптимум pH 2,0, пепсин В отличается повышенной термостабильностью, а пепсин С специализируется на гидролизе коллагеновых пептидов. Секреция пепсиногена регулируется не только гастрином, но и пептидами корма по механизму обратной связи [96-100]. В тонком отделе кишечника протеолиз продолжается под действием панкреатических ферментов. Как доказано в исследованиях (Грозина А.А. 2019; Ветрипраков В.Г. и др., 2023; Аюрзанева М.В. и Санжиева С.Е. 2009; Chia et al., 2011; Яровая Г.А. и др., 2009) центральное место в этом процессе занимает трипсин, который активируется из трипсиногена под действием энтерокиназы. У птиц обнаружены две молекулярные формы трипсина: трипсин-1, устойчивый к ингибиторам соевого шрота, и трипсин-2, чувствительный к ингибиторам типа Кунитца. Как установлено, химотрипсин птиц характеризуется расширенной субстратной специфичностью по сравнению с млекопитающими, панкреатическая секреция у кур-несушек составляет 12-15 мл/кг массы тела в сутки с концентрацией трипсиногена 2,1-3,8 мг/мл. Активация трипсиногена энтерокиназой в двенадцатиперстной кишке отличается высокой специфичностью [101-105]. Как доказано в исследованиях (Крюков В.С. и др., 2021; Мясоедов Н.Ф. и др., 2021) субстратная специфичность панкреатических ферментов демонстрирует следующие особенности: трипсин-1 наиболее активен в отношении связей Arg-X и Lys-X, трипсин-2 гидролизует Lys-X, химотрипсин эффективен против Phe-X, Leu-X и Val-X, а эластаза предпочитает связи Ala-X и Gly-X, важную роль играют карбоксипептидазы: CPA расщепляет ароматические аминокислоты, а CPB гидролизует Lys и Arg [106-107]. Заключительные этапы переваривания белков осуществляются мембраносвязанными пептидазами кишечных энтероцитов. Как показано в работах (Ляпина Л.А. и др., 2012; Куркин Д.В. и др., 2023; Зайко А.О. и др., 2013; Деев Р.В. и др., 2010) особое

значение имеют аланинаминопептидаза и дипептидилпептидаза IV, которые завершают процесс гидролиза. Как установлено, аланинаминопептидаза составляет до 8% всех мембранных белков энтероцитов и представлена тремя изоформами у бройлеров. Как доказано, дипептидилпептидаза-IV участвует в регуляции иммунного ответа через расщепление цитокинов. Уникальной особенностью птиц является исключительно высокая активность щелочной фосфатазы, которая в 2-3 раза превышает таковую у млекопитающих [108-111]. Регуляция протеолитической системы у птиц осуществляется на нескольких уровнях. В работах (Домшке С. и др., 1985; Вертипрахов В.Г. 2023; Смолин С.Г. 2008) нервная регуляция через блуждающий нерв стимулирует секрецию пепсиногена в желудке. Гуморальная регуляция с участием гастрина и секретина усиливает синтез и выделение панкреатических ферментов. Как установлено, гастрин коррелирует с уровнем белка в рационе, а секретин стимулирует выделение бикарбонатов и панкреатических ферментов. Локальная регуляция осуществляется продуктами частичного гидролиза белков, которые стимулируют секрецию энтерокиназы [112-115]. Как было отмечено в работах (Клемешова И.Ю. и др., 2021; Тарабанова Е.В. и др., 2011; Кудряшова Т.А. и др., 2022) состав рациона оказывает существенное влияние на активность протеолитической системы. Высокобелковые корма увеличивают массу поджелудочной железы на 18-22%, повышают экспрессию гена трипсиногена в 1,5 раза и активность трипсина на 80-120%. Как установлено, рационы с повышенным содержанием клетчатки снижают эффективность протеолиза на 25-40% за счет адсорбции ферментов на пищевых волокнах. Пшеничные отруби уменьшают активность трипсина на 30%, а растворимые β -глюканы овса ингибируют химотрипсин на 15-20% [116-119].

Как подчеркивают (Фролов В.Ю. и др., 2016; Мелешкина Е.П. и Витол И.С. 2018; Aguilar et al., 2021; Коротько Г.В. 2011) антипитательные факторы кормов значительно влияют на переваривание белков. Ингибиторы протеаз соевого шрота могут подавлять активность трипсина на 50-70%. Как

установлено, для их инактивации эффективны ферментативный гидролиз и обработка холодной плазмой. Было отмечено, что, танины не только связывают белки, но и образуют комплексы с протеазами, снижая их активность [120-123]. Как показано в работах (Андрианова Е.Н. и др., 2020; Фомичева Н.В. и др., 2021; Филькин С.Ю. и др., 2024; Байков М.В. 2023; Корягина А.О. и др., 2018; Махова А.А. и др., 2019.) добавка поливинилпирролидона уменьшает негативное действие танинов на 40-50%, практические аспекты оптимизации протеолиза включают контроль pH корма, применение ко-ферментации, повышающей усвояемость протеина на 12-15%. Перспективные разработки, такие как рекомбинантные ферменты и микрокапсулирование пепсинов, позволяют максимально реализовать питательный потенциал кормов. При разработке кормовых стратегий важно учитывать видовые особенности протеолиза у птиц. Дальнейшие исследования в области генной инженерии ферментов и персонализированного кормления открывают новые возможности для повышения эффективности использования кормового протеина [124-129].

Подводя итог, можно сказать, что протеолитическая система желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных птиц — это сложный и высокоспециализированный механизм. Он идеально адаптирован к особенностям их пищеварения. У млекопитающих переваривание белков устроено иначе, а у птиц оно начинается уже в железистом желудке. Там создаются оптимальные условия для активации ключевых ферментов, пепсинов разных изоформ. Каждый из них обладает уникальной субстратной специфичностью. Особенность пищеварения птиц это двухкамерное строение желудка, которое обеспечивает поэтапную обработку корма. В тонком кишечнике процесс продолжается под действием панкреатических ферментов. Основной среди них — трипсин, представленный несколькими молекулярными формами. Завершающие этапы гидролиза обеспечивают мембраносвязанные пептидазы. Необычно высокая активность отдельных ферментов, в частности щелочной фосфатазы, указывает на эволюционную

подстройку птиц к характеру питания. Протеолитическая система отличается многоуровневой регуляцией: нервные, гуморальные и локальные механизмы действуют согласованно. Работа системы при этом зависит от состава корма. Уровень белка и клетчатки, присутствие антипитательных факторов способны заметно менять активность ферментов. Перспективы оптимизации переваривания белков у сельскохозяйственных птиц связаны с рекомбинантными ферментами, микрокапсулированием и персонализированными кормовыми стратегиями. Их внедрение дает возможность полнее использовать питательный потенциал кормов и повышать продуктивность птицеводства.

Глубокое понимание протеолитической системы птиц не ограничивается теорией. Оно имеет практическое приложение: позволяет создавать более эффективные системы кормления и улучшать экономические показатели птицеводческих хозяйств.

1.5 Тренды протеинового и аминокислотного питания в нутрициологии животных

Подходы к протеиновому и аминокислотному питанию сельскохозяйственных животных, и в первую очередь бройлеров, заметно перестраиваются. Буряков Н.П. и др. (2023) и Die (2021) объясняют это двумя задачами: полнее использовать белок корма и одновременно снизить экологическую нагрузку. Соевый шрот и рыбная мука сохраняют позиции, однако их все чаще дополняют инновационными источниками [130–131]. В таблице 1.5.1. сопоставлен аминокислотный состав разных источников белка, применяемых в кормлении бройлеров (г/100 г белка):

Таблица 1.5.1- Аминокислотный профиль белковых кормовых КОМПОНЕНТОВ:

Корм	Лизин	Метионин	Треонин	Триптофан	Лейцин	Изолейцин	Валин
Соевый шрот	6,2	1,4	3,8	1,3	7,8	4,5	4,9
Рыбная мука	7,5	2,8	4,2	1,1	8,2	4,8	5,3
Мука из личинок	5,8	1,9	3,5	0,9	6,9	3,9	5,1
Дрожжевой белок	6,0	1,6	4,0	1,4	7,2	4,2	5,0

Особый интерес, как подчеркивают (Крючков И.А. и Никишов А.А. 2025; Буряков Н.П. и др., 2024; Хамви М.Н. 2025.), представляет использование белковых продуктов из насекомых, содержащих 40-60% сырого протеина с высоким содержанием лизина (5-6%) и метионина (1,5-2,0%), микробный белок (дрожжи, бактерии) с содержанием протеина 50-70% и полным аминокислотным профилем также показывает высокую эффективность. Важным прорывом стало применение ВСАА (лейцина, изолейцина и валина), которые при введении в количестве 1,5-2,0% от общего протеина рациона повышают среднесуточные приросты на 8-12% и улучшают конверсию корма на 5-7% [132-134]. Современные рационы, как было отмечено в работе (Hamwi 2024), активно включают синтетические аминокислоты, что позволяет снизить уровень сырого протеина на 15-20% без потери продуктивности, одновременно уменьшая выделение азота на 25-30% [135]. В таблице 1.5.2 показана эффективность различных ферментных препаратов в кормлении цыплят-бройлеров.

Таблица 1.5.2 - Влияние ферментных добавок на продуктивность бройлеров:

Группа	Привесы, г/сут	Конверсия корма	Использование протеина, %
Контроль	58,3±1,2	1,72±0,03	62,4±1,1
Протеаза	63,1±1,4*	1,63±0,02*	68,2±1,3*
Протеаза+протеаза	65,8±1,5**	1,58±0,02**	71,5±1,4**

Как было установлено в работах (Буряков и др., 2020; Хамви 2024; Краснаярова и др., 2024; Kim et al., 2024.) развитие прецизионных технологий персонализированного кормления с использованием датчиков активности и ИИ позволяет корректировать рацион в реальном времени. Ферментативная обработка кормов экзогенными протеазами (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*) имеет особое значение. Она повышает усвояемость белка на 10-15 %. Современные тенденции включают устойчивое производство кормов с акцентом на круговое использование азота и снижение углеродного следа. Перспективное направление это разработка кормовых добавок на основе ВСАА с контролируемым высвобождением [136-139].

Если обобщить, современное кормление бройлеров переживает революционные изменения. Они направлены на максимальную эффективность использования питательных веществ. Переход на инновационные источники белка, включая продукты из насекомых и микробный белок, позволяет существенно повысить продуктивность птицы. Особое значение имеет применение аминокислот с разветвлённой цепью (ВСАА) и синтетических аминокислот. Они не только стимулируют рост, но и снижают экологическую нагрузку.

Современные технологии кормления, включая системы прецизионного питания и ферментативную обработку кормов, открывают новые возможности для оптимизации рационов. Особую перспективу представляют разработки кормовых добавок с контролируемым высвобождением активных компонентов, позволяющие поддерживать оптимальный уровень питательных веществ в организме птицы.

Таким образом, комплексный подход к организации кормления, сочетающий передовые источники белка, современные технологии и экологически ориентированные решения, выводит птицеводство на качественно новый уровень. Дальнейшее развитие этого направления обещает существенный прогресс в эффективности производства птицеводческой продукции

1.6. Методология использования показателей переваримости сухого вещества и протеина *in vitro*

Современная зоотехническая наука в поисках эффективных, воспроизводимых и экономичных методов оценки питательности кормовых средств и эффективности кормовых добавок широко использует методологию *in vitro*. Как отмечают (Tilly J.M.A et al., 1963; Adedokun 2008, et al 1997; Bryan et al., 2020.) данные методы, моделирующие процессы пищеварения в искусственно созданных условиях, позволяют получать прогнозные показатели истинной переваримости питательных веществ, что особенно ценно для скрининга новых компонентов, ферментных препаратов и оптимизации рецептур комбикормов [140-142]. Основополагающей для оценки переваримости у жвачных животных стала классическая двухэтапная методика Tilley and Terry (1963), которая последовательно имитирует рубцовое и кишечное пищеварение. Однако, как подчеркивают (Мирошников С.А. и др., 2018; Cowieson & Klueener 2017.), для моногастричных животных, в частности для птицы, были разработаны иные подходы, учитывающие специфику их пищеварительного тракта — отсутствие рубцового ферментативного гидролиза и кислую среду желудка [143-144]. Современные методы оценки переваримости *in vitro* для птицы, как правило, основаны на моделировании желудочной и кишечной фаз. Стандартный протокол, по данным Пахомова В.И. и др. (2020) и Coffey et al. (2016), строится в два этапа. Сначала измельченный образец корма инкубируют в пепсино-солянокислой среде (pH 2,0–3,0) при 39–41 °C — так имитируют желудочное пищеварение. Затем среду нейтрализуют и инкубируют с панкреатином или комплексом кишечных ферментов при pH 6,8–7,5, что соответствует гидролизу в тонком кишечнике. Переваримость оценивают по доле сухого вещества или протеина, перешедшей в растворимую форму после ферментативной обработки; отделяют ее центрифугированием или фильтрацией [145–146].

Сложнее и актуальнее выглядит оценка переваримости протеина из альтернативных, трудногидролизуемых источников — перьевой и

мясокостной муки, богатых кератином и коллагеном (Rojas, Stein, 2015; Казакова Е.Ф. и др., 2020). Здесь в протоколы *in vitro* вводят предварительную обработку восстановителями. Один из примеров — дитиотреитол, необходимый для разрыва дисульфидных связей кератина. Дополнительно применяют специфические протеазы (кератиназы, коллагеназы) либо их комбинации. Такой подход точнее воспроизводит потенциальное действие экзогенных ферментных добавок [147–148].

Валидация (сопоставление с данными *in vivo*) и верификация (оценка воспроизводимости) — это краеугольные камни методологии *in vitro*. В мета-анализе Olukosi O.A et al. (2015) и Попова В.В. (2022) показано, что для стандартных растительных ингредиентов корреляция между показателями переваримости сухого вещества и протеина, полученными *in vitro* и *in vivo*, может достигать $R^2 = 0,85-0,95$. Однако Slominski (2022) указывает, что для белков животного происхождения и рационов с включением ферментов эта корреляция может быть ниже. Поэтому нужны адаптированные модели и учёт большего числа факторов: размера частиц, времени инкубации, специфической активности ферментов [149-151]. Критическим аспектом методологии, по мнению (Ravindran et al 1999; Wang&Parsons1998), является стандартизация условий проведения анализа. Вариабельность результатов может быть вызвана различиями в активности коммерческих препаратов ферментов, pH буферных растворов, скорости и времени инкубации. Это обуславливает необходимость использования внутренних стандартов и межлабораторных сличительных испытаний для обеспечения сопоставимости данных [152-153]. Важнейшим направлением развития методологии, как отмечают (Мезенова О.Я. 2023; Liu et al., 2013), является создание высокопроизводительных систем *in vitro*, позволяющих одновременно тестировать множество образцов с варьируемыми условиями (градиенты pH, доз ферментов). Перспективу открывает объединение методов *in vitro* с клеточными культурами — моделями энтероцитов. Такой подход позволяет оценивать не только степень гидролиза, но и биодоступность

высвободившихся аминокислот и пептидов [154–155]. Основные методы оценки переваримости *in vitro*, используемые в исследованиях питания птицы, сведены в таблице 1.6.1.

Таблица 1.6 – Характеристика основных методов оценки переваримости *in vitro* для птицы

Метод (Автор, год)	Моделируемый отдел ЖКТ	Ключевые условия и применение
Pepsin/Pancreatin (Boisen & Fernández, 1997)	Желудок и тонкий кишечник	Последовательная инкубация (pH 2,0 → pH 6,8). Базовая оценка доступности протеина корма
Многоступенчатый гидролиз (Ravindran et al., 1999)	Точная физиологическая модель	Инкубация с индивидуальными ферментами (пепсин, трипсин, химотрипсин). Изучение специфических ингибиторов
С кишечным содержимым (Zhao et al., 2014)	Фактическая среда кишечника	Использование гомогената содержимого кишечника птиц. Валидация эффективности экзогенных протеаз
С предварительной обработкой (Wang & Parsons, 1998)	Модель с вспомогательной обработкой	Химическая (DTT) или ферментативная предобработка образца. Скрининг эффективности для кератинсодержащего сырья

Методология оценки переваримости сухого вещества и протеина *in vitro* быстро развивается и прочно вошла в арсенал исследований кормления. Точности этих методов достаточно для скрининга и сравнительного анализа: они дают возможность прогнозировать питательную ценность кормовых ингредиентов и эффективность ферментных препаратов, включая протеазы.

Это напрямую соответствует задачам нашей работы. Развитие методов в сторону большей физиологической релевантности, стандартизации и высокой производительности открывает новые возможности. Оно позволяет глубже изучать процессы пищеварения и оптимизировать рационы сельскохозяйственной птицы.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Диссертационная работа обобщает многолетние комплексные исследования, которые выполнялись с 2023 по 2026 год. Работа шла на базе ведущих научных учреждений и производственных площадок Российской Федерации.

Лабораторные исследования *in vitro* проводили в Центре коллективного пользования и на кафедре кормления животных ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Часть анализов выполняли в аккредитованном Научно-испытательном центре «Черкизово».

Лабораторные исследования *in vitro* по определению протеолитической активности ферментных препаратов проводили на базе аккредитованного Научно-испытательного центра «Черкизово». Этот центр принадлежит ГК «Черкизово» (Москва, Яковлевское) и имеет аттестат аккредитации на соответствие ГОСТ ISO/IEC 17025:2019. Там же отработывали и валидировали методы оценки переваримости сухого вещества и сырого протеина мясокостной и перьевой муки. В части разработки теоретических основ методов и статистической обработки результатов использовались мощности Центра коллективного пользования и кафедры кормления животных РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Эксперименты *in vivo*, выполненные в виварии ФГБОУ ВО Волгоградского ГАУ (разделы 3.3, 3.4, 3.5, 3.6 – первый, второй, третий, четвертый научно-производственный опыт), проводились в клеточных батареях с соблюдением зоогигиенических норм. Производственная проверка (раздел 3.7) проведена в условиях промышленного птичника АО «Куриное царство» в ЗАО «Моссельпром» - БЦ "Константиново-1, Московская Область.», при напольном содержании птицы.

Структура и последовательность научных изысканий разрабатывалась с учетом необходимости решения фундаментальных вопросов методологии оценки питательности кормов и прикладных задач оптимизации кормления сельскохозяйственной птицы, что определило реализацию работы в три

логически взаимосвязанных этапа (исследования *in vitro* и *in vivo*, а также производственная проверка. Общая схема проведенных исследований представлена на рисунке 2.1. и в таблице 2.4

2.1. Лабораторные исследования *in vitro*

Лабораторные исследования *in vitro* по определению протеолитической активности ферментных препаратов, а также по отработке и валидации методов оценки переваримости сухого вещества и сырого протеина мясокостной и перьевой муки проводили на базе аккредитованного Научно-испытательного центра «Черкизово» (собственность ГК «Черкизово»), имеющего аттестат аккредитации на соответствие ГОСТ ISO/IEC 17025:2019. В части разработки теоретических основ методов и статистической обработки результатов использовали мощности Центра коллективного пользования и кафедры кормления животных РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Первый этап, посвященный лабораторным исследованиям *in vitro*, стал основой для разработки и совершенствования методологического аппарата, необходимого для объективной оценки переваримости протеина и активности ферментных препаратов согласно ГОСТ Р 55987-2014[156] «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения переваримости *in vitro*». Был разработан и валидирован модифицированный двухэтапный *in vitro* метод, основанный на концепции Boisen & Fernández (1997) [157]. Данный метод предусматривает последовательную симуляцию физиологических условий желудочно-кишечного тракта. Первая стадия (желудочная) заключается в инкубации тонкоизмельченной и обезжиренной пробы кормового сырья в 0,2% растворе пепсина свиного происхождения (активность 320–1000 ед./мг), приготовленном на 0,075 М растворе соляной кислоты, при температуре $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 6 часов при постоянном перемешивании. По истечении желудочной фазы проводится нейтрализация среды до pH 7,5, после чего следует вторая стадия (кишечная), включающая инкубацию с панкреатином в течение 18 часов при 37 °C. По окончании гидролиза нерастворимый остаток отделяют фильтрованием через

предварительно высушенные и взвешенные беззольные фильтры, тщательно промывают для удаления солей и растворимых пептидов, высушивают при $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ до постоянной массы и взвешивают. Переваримость сырого протеина рассчитывали по разность массовой доли азота, определенной методом Кьельдаля [158] в исходной пробе и в негидролизованном остатке.

Процедура валидации была проведена согласно ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures — Scientific guideline (EMA/CHMP/ICH/804363/2022, 14.06.2024) [159]. Оценка правильности проводилась методом добавок с использованием бычьего растворимого казеина (CAS No. 9000-71-9, Beijing, China), который вводили в исследуемые образцы в количестве 10–30% от массы собственного белка. Средний процент восстановления (recovery) составил 98,5–102,5%, что свидетельствует о высокой точности методики. Прецизионность оценивалась в условиях повторяемости (шесть параллельных определений одного образца одним оператором в один день) и внутрилабораторной воспроизводимости (двадцать определений разными операторами в разные дни). Относительное стандартное отклонение повторяемости составило 1,8%, а внутрилабораторной прецизионности – 2,5%. Совокупная стандартная неопределенность, рассчитанная с учетом вкладов основных источников вариабельности (взвешивание, измерение объемов, определение азота, прецизионность метода), при коэффициенте охвата $k=2$ дала расширенную неопределенность (U) $\pm 3,5\%$ для значения переваримости протеина. Протеолитическую активность определяли спектрофотометрическим методом, основанным на измерении количества пептидов и свободных аминокислот, высвобождаемых при гидролизе стандартного белкового субстрата — казеина — под действием ферментов тканевого гомогената (Балаян В.М., Левницкий А.П., 1984) [160]. Методика отбора и пробоподготовки биологических образцов поджелудочной железы и кишечника. В рамках исследования были проведены стандартные процедуры отбора и гомогенизации тканей поджелудочной железы и кишечника, а также содержимого кишечника (химуса). Поджелудочную железу выделяли, после

чего отбирали навески массой от 50 до 100 мг, которые немедленно подвергали механической гомогенизации в соответствующем буферном растворе (в ледяном фосфатно-солевом буфере, pH 7,4) с использованием гомогенизатора Allsheng (Bioprep-24R), Yocell (Китай), что обеспечивало дезинтеграцию тканевых структур при сохранении целостности внутриклеточных органелл. Для анализа кишечного содержимого тонкий кишечник вскрывали продольным разрезом с помощью стерильного хирургического скальпеля. Химус массой приблизительно 100 мг аспирировали или аккуратно отбирали тем же скальпелем из различных анатомических отделов (двенадцатиперстная, тощая, подвздошная кишка) с целью оценки пространственной вариабельности его состава. Для предотвращения загрязнения образцов пристеночной микрофлорой и тканевыми ферментами, после отбора химуса просвет кишечника тщательно промывали охлажденным физиологическим раствором (0,9% NaCl) до визуального удаления остатков содержимого. Следующим этапом проводили отбор пристеночной (мукозной) ткани кишечника. С помощью скальпеля осторожно отделяли фрагменты слизистой оболочки (возможно, с подслизистой основой) массой от 10 до 50 мг, избегая включения мышечных слоев. Эти образцы, как и ткань поджелудочной железы, сразу гомогенизировали в соответствующем буфере. Все операции вели на ледяной бане при постоянном охлаждении — так ограничивали протеолитическую деградацию и инактивацию ферментов. Гомогенаты центрифугировали при 4 °C для отделения клеточного дебриса, а супернатанты использовали далее для определения активности пищеварительных ферментов, оценки белкового состава и метаболомных исследований.

Навеску ткани 0,5 г гомогенизировали в 4,5 мл холодного 0,1 М фосфатного буфера (pH 7,4), получая 10 % гомогенат. Каждый образец ставили в трёх параллельных пробах: опытной, контрольной и холостой. В опытной пробе 0,2 мл гомогената инкубировали с 0,8 мл 1 % раствора казеина

(рН 7,4) в течение 60 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 4,0 мл 10 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

Эта кислота осаждает нерасщеплённый белок и высокомолекулярные пептиды. Контрольную пробу готовили аналогично, но ТХУ вносили до инкубации для учёта неферментативного гидролиза и собственного поглощения компонентов гомогената. В холостой пробе гомогенат заменяли дистиллированной водой. После осаждения пробы центрифугировали (3000 об/мин, 5–10 мин). Оптическую плотность надосадочной жидкости, содержащей растворимые продукты гидролиза, измеряли при 280 нм против холостой пробы. Детекция при данной длине волны основана на способности ароматических аминокислот (тирозина и триптофана), входящих в состав казеина, поглощать УФ-свет при их высвобождении в результате протеолиза; интенсивность поглощения пропорциональна количеству расщеплённого субстрата. Активность фермента (А) рассчитывали по формуле, выражая её в микрограммах тирозиновых эквивалентов, высвобождаемых за минуту инкубации одним граммом ткани:

$$A = \frac{\Delta E \times V \times 30}{0,290 \times V_1 \times M \times t};$$

Где ΔE - разность оптических плотностей опытной (E_1) и контрольной (E_2) проб; V -общий объём гомогената (5 мл); V_1 -объём гомогената взятый в анализ (0,2 мл); M - масса навески ткани (0,5 г); t - время инкубации (60 мин); 30-количество тирозина (мкг), соответствующее оптической плотностью 0,290 при 280 нм (использовали для пересчёта в тирозиновые эквиваленты)

2.2. Эксперименты *in vivo*

Эксперименты *in vivo*, выполненные в виварии ФГБОУ ВО Волгоградского ГАУ (разделы 3.3, 3.4, 3.5–3.6), проводились в клеточных батареях с соблюдением зоогигиенических норм. Производственную проверку (раздел 3.7) проводили в условиях промышленного птичника АО «Куриное царство» (ЗАО «Моссельпром» – БЦ «Константиново-1») при

напольном содержании. Ниже представлено последовательное описание четырёх экспериментов.

Первый научно-хозяйственный опыт (раздел 3.3)

Цель – изучение влияния различных уровней и композиций экзогенных протеаз в стандартных по питательности рационах с включением мясокостной муки.

В опыте было сформировано 5 групп (табл. 2.1): Контрольная группа: птица получала базовый комбикорм, полностью соответствующий нормам кормления для кросса «Ross 308», без добавления экзогенных протеаз. Опытная группа (I): рацион аналогичен контрольному, с добавлением протеаз КЕМЗАЙМ в дозе 200 г/т. Опытная группа (II): рацион аналогичен контрольному, с добавлением протеаз Стеллар Про в дозе 200 г/т. Опытная группа (III): рацион с увеличенной общей дозой ферментного комплекса – 400 г/т (по 200 г/т каждой). Опытная группа (IV): рацион обогащён максимальной дозой ферментов – 500 г/т (по 250 г/т каждой). Все группы получали одинаковый базовый рацион, сбалансированный по питательности, с включением 5–7,5% мясокостной муки. Единственным различием было наличие и количество ферментной добавки.

Второй научно-хозяйственный опыт (раздел 3.4)

Цель – оценка эффективности низкопротеиновых растительных рационов, сбалансированных кристаллическими аминокислотами (лизин, метионин, треонин, валин, изолейцин), без протеаз и с добавлением протеаз.

Схема опыта представлена в таблице 2.2. Все рационы не содержали перьевой муки. В опытных группах уровень сырого протеина (СП) был снижен на 2,0 п.п. на старте (до 19,0%) и на 1,5 п.п. на росте и финише (до 17,5%) по сравнению с контролем (старт 21,0%, рост/финиш 19,0%). Дефицит аминокислот компенсирован кристаллическими формами.

Продолжительность опыта – 35 суток. Оценивали продуктивность, мясные качества, биохимические показатели крови (общий белок, мочевиная кислота, АЛТ, АСТ, кальций, фосфор и др. на автоматическом анализаторе

Sapphire-400, Япония), а также переваримость питательных веществ (обменный опыт).

Таблица 2.1. Схема экспериментальных групп, дозировки ферментов и состава добавки (первый эксперимент)

Группа	Доза протеаз, г/т корма	Состав добавки (каждая в равной доле)
Контроль	0	Без добавки
I опытная	200	КЕМЗАЙМ® (200 г/т)
II опытная	200	Стеллар Про (200 г/т)
III опытная	400	КЕМЗАЙМ® (200 г/т) + Стеллар Про (200 г/т)
IV опытная	500	КЕМЗАЙМ® (250 г/т) + Стеллар Про (250 г/т)

Таблица 2.2. Схема экспериментальных групп, уровня сырого протеина, дозировки ферментов и аминокислотной балансировки рационов (второй эксперимент)

Группы	Уровень СП, % по фазам			Общая доза протеаз, г/г *	Аминокислоты
	Старт	Рост	Финиш		
	6% кукурузный глютен				
Контроль	21,00	19,00	19,00	0	нет
Опытная I	19.00 (-2.0) **	17.50 (-1.5) **	17.50 (-1.5) **	(200 Кемзайм + 200 Стеллар)	есть
Опытная II	19.00 (-2.0) **	17.50 (-1.5) **	17.50 (-1.5) **	(250 Кемзайм + 250 Стеллар)	есть

* Протеазы: КЕМЗАЙМ® (Kemin Industries, США); Стеллар Про (Shandong Lonct Enzymes Co., Ltd., Китай); ** Снижение сырого протеина против контроля

Третий научно-хозяйственный опыт (разделы 3.5 – 3.6)

Работа оценивает практический потенциал разных дозировок комплекса протеаз (500 и 1000 г/т) и кристаллических аминокислот в низкопротеиновых рационах бройлеров с 6 % перьевой муки. Отдельно измеряли экологический эффект — экскрецию азота с помётом.

Опыт (табл. 2.3.1) включал четыре группы. Перьевая мука входила во все рационы в количестве 6 %. Контрольная группа получала полноценный рацион с СП 21/19/19 %. В опытных группах уровень СП снижали до 19/17,5/17,5 % и корректировали аминокислотный состав. Группа II получала протеазы в дозе 500 г/т (по 250 г/т каждого препарата), группа III — 1000 г/т (по 500 г/т).

Таблица 2.3.1. – Схема экспериментальных групп (третий эксперимент)

Группа	Сырой протеин, % (старт/рост/финиш)	Перьевая мука, %	Протеазы, г/т	Аминокислоты
Контроль	21,0 / 19,0 / 19,0	6	0	нет
Опытная I	19,0 / 17,5 / 17,5	6	0	есть
Опытная II	19,0 / 17,5 / 17,5	6	500	есть
Опытная III	19,0 / 17,5 / 17,5	6	1000	есть

Кроме продуктивных показателей и убойных качеств, проводили **Органолептическую оценку**. Оценивали варёное и печёное мясо, а также бульон. Использовали 5-балльную шкалу. Дегустационная комиссия состояла из 7 человек, обученных по ISO 8586. Условия дегустации соответствовали ISO 8589, а дескрипторы были выбраны по ISO 13299. Органолептический анализ качества мяса грудных и бедренных мышц бройлеров, а также бульона, полученного при варке тушек, проводился в соответствии с требованиями системы стандартов ISO 8586, ISO 8589, ISO 5496, ISO 4121, ISO 13299 и

ГОСТ ISO 6658-2016, регламентирующих организацию и проведение сенсорных испытаний пищевых продуктов.

Формирование дегустационной комиссии. Для проведения оценки была сформирована дегустационная комиссия из семи квалифицированных специалистов, прошедших предварительный отбор в соответствии с процедурами, установленными в ISO 8586 (ГОСТ ISO 8586). Указанный стандарт определяет критерии отбора экспертов-дегустаторов, требования к их сенсорным способностям (острота обоняния, вкусовая чувствительность), а также порядок периодического контроля и поддержания рабочих навыков. Все члены комиссии были проинструктированы о целях испытания и ознакомлены с используемой пятибалльной шкалой и дескрипторами.

Условия проведения дегустации. Дегустация проходила в специализированной лаборатории, оборудованной в строгом соответствии с ISO 8589. Помещение поддерживало нейтральные условия: температура воздуха 20–22 °C, относительная влажность 50–60 %, равномерное рассеянное освещение около 500 лк без доступа естественного света, нейтральный серый цвет стен и мебели. Каждый дегустатор работал в отдельной изолированной кабине — взаимное влияние оценок исключалось. Образцы подавали в стандартной одноразовой посуде, каждый имел трёхзначный цифровой код, порядок подачи был случайным. Подготовка и презентация образцов опирались на ISO 5496: температура подачи (варёное мясо 60–65 °C, бульон 55–60 °C), размеры порций, нейтральная среда.

Оценку вели по четырём ключевым дескрипторам для каждого типа продукта. Принципы профильного анализа заимствованы из ISO 13299 (ГОСТ ISO 13299-2015). Внешний вид характеризовали по состоянию поверхности, наличию посторонних включений и цвету. Консистенцию — по плотности, упругости и нежности при разжёвывании. Запах — по типичности для варёного или запечённого мяса курицы и отсутствию посторонних оттенков. Вкус оценивали для бульона, сочность и нежность — для мяса. Для варёной

грудки дополнительно фиксировали нежность и сочность, для запечённого бедра — внешний вид корочки и аромат запекания.

Каждый показатель измеряли по пятибалльной количественной шкале ISO 4121 с равными интервалами между баллами. Пять баллов — свойство выражено максимально, без замечаний. Четыре — незначительные отклонения от идеала. Три — заметные, но приемлемые отклонения. Два — существенные недостатки. Один — неприемлемо. Каждый дескриптор сопровождался словесным описанием, привязанным к конкретному баллу. Для нежности варёной грудки: «5 — волокна легко разделяются, не требуют усилий при пережёвывании; 4 — нежные, с минимальным усилием; 3 — умеренно плотные; 2 — жёсткие; 1 — резинистые».

Дегустация шла в три этапа. Сначала оценивали варёное белое мясо (грудка), затем варёное красное (бедро), после — бульон и, при необходимости, запечённое мясо. Между этапами делали перерыв не менее 5 минут. Между образцами полость рта очищали нейтральным крекером и водой комнатной температуры.

Балльные оценки усредняли по каждому образцу, рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Достоверность различий между контрольной и опытными группами определяли по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$. Обработку выполняли по ГОСТ ISO 6658-2016, устанавливающему общие требования к статистическому анализу результатов сенсорной оценки.

Оценку экологической эффективности: отбирали пробы помёта. Общий азот (TN) определяли методом Кьельдаля, аммонийный азот ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) — колориметрически. На этой основе рассчитывали ретенцию азота. Экологическую сторону оценивали через выделение азота с помётом, опираясь на данные о потреблении и переваримости протеина; это показывало, насколько можно снизить азотную нагрузку на окружающую среду. Использовали куриный помёт, пробы которого брали в нескольких местах. После сбора образцы тщательно перемешивали в пластиковой ёмкости до

составного образца, упаковывали в герметичные пластиковые пакеты и доставляли в лабораторию для анализа. Образцы высушивались на воздухе, измельчались и просеивались через сито с размером ячейки 1 мм для дальнейшего анализа. рН образцов определялся в соотношении 1:2 (помет к деионизированной воде). Влажность оценивалась путем высушивания куриного помета в печи при 110 °С в течение 6 часов. Общее содержание азота (TN) и общего анализировалось путем сжигания образцов куриного помета в анализаторе Nanon (Китай). Минеральный азот (NH_4N и NO_3N) определяли с использованием соотношения 1:60 (литр к 2М KCl), экстракт пропускали через фильтровальную бумагу № 42 и анализировали с помощью проточного инъекционного анализатора Skalar SAN++ Skalar (Нидерланды). Все лабораторные анализы кормового сырья, комбикормов и биологических образцов проводились с использованием стандартных, общепринятых в зоотехническом анализе методик. Содержание сырого протеина определяли по методу Кьельдаля (ГОСТ 13496.4) [169], сырого жира – экстракцией в аппарате Сокслета (ГОСТ 13496.15) [170], сырой клетчатки – по методу Геннеберга-Штомана (ГОСТ 13496.2) [171], золы – прокаливанием в муфельной печи (ГОСТ 13979.3) [172], влаги – высушиванием до постоянной массы (ГОСТ 13979.1) [173].

Четвёртый опыт – производственная проверка (раздел 3.7)

Цель – интегральная проверка наиболее эффективной, по результатам предыдущих опытов, схемы кормления в масштабе, приближённом к реальному производственному циклу. Согласно схеме эксперимента таблицы 2.3, на двух идентичных по конструкции и оборудованию птичниках АО «Куриное царство» было размещено по 20 000 суточных цыплят кросса «Ross 308». В одном птичнике применялась базовая (контрольная) схема кормления (стандартный полноценный рацион без перьевого муки и протеаз), в другом – опытная схема (низкопротеиновый рацион с 6% перьевого муки, сбалансированный кристаллическими аминокислотами и обогащённый комплексом протеаз в дозе 500 г/т – по 250 г/т каждого препарата). Управление

микроклиматом, кормлением и поением – автоматизированное. В течение 42-дневного цикла учитывали: расход корма (ежедневно по линии), живую массу (еженедельно, не менее 100 голов из разных зон), падёж (ежедневно), конверсию корма (FCR), сохранность поголовья, выход мяса с 1 м². На основе этих данных выполнен экономический анализ (стоимость кормов, себестоимость прироста, дополнительная прибыль).

Таблица 2.3.2. - Схема экспериментальных групп, тип рационов и кормовых добавок

Группа	Тип рациона	Ключевые добавки
Контроль	Стандартный, полноценный	Без перьевой муки и протеаз
Опытная	Низкопротеиновый + 6% перьевой муки 19,0 / 17,5 / 17,5 СП	1. Кристаллические аминокислоты 2. Комбинированные протеазы (KEMZAYM® + Стеллар Про) по 250 г/т каждой * Всего 500 г/т

*примечание: суммарно 500 г/тон опытных групп соответственно

2.3. Зоотехнический, биохимический и статистический анализ

Обменный опыт. На завершающем этапе каждого *in vivo* эксперимента (35–39-е сутки) от каждой группы отбирали по 6–8 голов со средней живой массой. Птицу размещали в индивидуальные метаболические клетки (адаптация 2 дня, учёт 3–5 дней). Ежедневно учитывали заданный корм, остатки и весь помёт. Рассчитывали коэффициенты переваримости сухого вещества, сырого протеина, сырого жира, а также ретенцию азота.

Биохимия крови. Кровь отбирали из подкрыльцевой вены в вакуумные пробирки с активатором свертывания. После центрифугирования (3000 об/мин, 10 мин) сыворотку анализировали на автоматическом анализаторе Sapphire-400 (Япония) с использованием коммерческих наборов реагентов. Определяли: общий белок, альбумины, мочевую кислоту, активность АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, глюкозу, кальций, фосфор.

Анализ кормов. Содержание сырого протеина – по Кьельдалю (ГОСТ 13496.4), сырого жира – экстракцией в аппарате Сокслета (ГОСТ 13496.15),

сырой клетчатки – по Геннебергу-Штоману (ГОСТ 13496.2), золы – прокаливанием (ГОСТ 13979.3), влаги – высушиванием (ГОСТ 13979.1).

Статистическая обработка. Первичную обработку данных — средние арифметические (M), стандартное отклонение (SD) и стандартную ошибку (m) — выполняли в Microsoft Excel 2010. Достоверность различий между группами проверяли по t-критерию Стьюдента в пакете Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Порог значимости задавали на уровнях $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,001$.

Для наглядности основные параметры четырёх экспериментов сведены в таблицу 2.4.

Таблица 2.4 – Последовательность и ключевые параметры экспериментов

Эксп. / разд.	Суть	Общие ключевые параметры рационов / дозировки
1 эксп. р. 3.3	Влияние разных уровней протеаз на фоне мясокостной муки (рационы стандартного протеина)	Стандартный уровень СП (21–19%); протеазы 200, 400, 500 г/т (моно и комбинации); мясокостная мука 5–7,5%
2 эксп. р. 3.4	Низкопротеиновые растительные рационы, сбалансированные кристаллическими аминокислотами, без протеаз и с протеазами	Снижение СП на 2,0–1,5 п.п.; кристаллические аминокислоты (лизин, метионин, треонин, валин, изолейцин); протеазы (400,500 г/т)
3 эксп. р. 3.5 - 3.6	Низкопротеиновые рационы с 6% перьевой муки + кристаллические аминокислоты + разные дозы протеаз (500 и 1000 г/т). Оценка продуктивности, качества продукции (органолептики), показатели, влияющие на экологическую стабильность.	Перьевая мука 6%; снижение СП; аминокислотная коррекция; протеазы 500 и 1000 г/т (комбинация)
4 эксп. р. 3.7	Производственная проверка на 20 000 гол. в условиях АО «Куриное царство»	Оптимальный рацион из опыта 3 (низкий СП, 6% перьевой муки, аминокислоты, протеазы 500–1000 г/т)

2.4. Характеристика ферментных препаратов:

КЕМЗАЙМ® Протеаза (Kemin Industries, США) — комплексная кормовая добавка на основе протеаз грибного происхождения. Продуценты — штаммы микроскопических грибов рода *Aspergillus*. Широкий диапазон pH-оптимума обеспечен сочетанием кислотных, нейтральных и щелочных протеаз, поэтому ферменты действуют в разных отделах желудочно-кишечного тракта. Кислотные протеазы работают в желудке (pH 2,0–4,0) и запускают гидролиз белков; нейтральные и щелочные продолжают процесс в тонком кишечнике (pH 6,0–8,0). Механизм основан на эндопептидазной активности — расщеплении внутренних пептидных связей. Такой механизм особенно результативен против нативных, денатурированных и структурно сложных белков, включая кератин перьевой муки. Препарат термостабилен, устойчив к эндогенному пепсину; его назначение — повышать общую переваримость протеина корма и снижать действие антипитательных факторов.

Протеаза (Shandong Lonct Enzymes Co., Ltd., Китай) — моно- или олигокомпонентная кормовая добавка на основе протеаз бактериального происхождения. Фермент получают промышленными штаммами бактерий рода *Bacillus* в ходе контролируемой глубинной ферментации.

Данный препарат характеризуется выраженной нейтрально-щелочной протеолитической активностью с оптимумом действия в диапазоне pH 6,0–8,5, что соответствует физиологическим условиям тонкого отдела кишечника птицы и жвачных животных. Его механизм также относится к эндопептидазам, препарат отличается высокой стабильностью в условиях кишечника и устойчивостью к инаktivации собственными протеазами животного.



3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Валидация и верификация методов оценки активности протеаз с использованием методик разных производителей

Цель этой части работы состояла в том, чтобы разработать усовершенствованные, стандартизированные методы определения активности кислых, нейтральных и щелочных протеаз. Эти методы должны были быть адаптированы к специфическим матрицам: коммерческим ферментным препаратам, премиксам и готовым комбикормам. Корректное и воспроизводимое измерение протеолитической активности было фундаментальной задачей. Оно нужно для точного дозирования ферментов в рационы, корректной интерпретации данных *in vitro* и *in vivo*, а также для объективного сравнения эффективности разных коммерческих продуктов. В рамках исследования мы провели сравнительную оценку, валидацию и верификацию существующих стандартизированных методов. Эти методы описаны в документах ведущих производителей и в национальных стандартах. На основе критического анализа их преимуществ и ограничений мы разработали оптимизированные протоколы. Они обеспечивают высокую точность, воспроизводимость и применимость для целевых матриц. Также был проведён анализ и сравнительная характеристика исходных методов-прототипов. В качестве основы для модификации выбрали три репрезентативных метода. Они охватывают разные принципы детекции и области применения.

Первый метод предполагал спектрофотометрическое определение с использованием окрашенного субстрата. За основу взяли стандарт Danisco Animal Nutrition. Это прямой колориметрический анализ. Он оптимизирован для определения активности бактериальных протеаз (например, от *Bacillus spp.*) в сложных кормовых матрицах. В основе метода лежит гидролиз нерастворимого окрашенного (азуринового) сшитого казеина. В результате образуются растворимые окрашенные пептиды. Интенсивность окраски

супернатанта измеряли при 590 нм. Она была пропорциональна протеолитической активности. Условия анализа были такими. Реакцию проводили при 50 °С и pH 10,0 в Tris-HCl буфере. Продолжительность 60 минут. В реакционную смесь добавляли додецилсульфат натрия (SDS) для денатурации субстрата. Реакцию останавливали добавлением тринатрийфосфата. За единицу активности принимали условную единицу (U). Это количество фермента, которое высвобождает 2,3 мкг фенольных соединений (в пересчёте на тирозин) за 1 минуту в стандартных условиях. Метод предполагал построение калибровочной кривой с использованием стандарта, внесенного в инертную кормовую матрицу, для учета матричных эффектов. Заявленный диапазон измерения составлял 1022–5500 U/кг корма. Коэффициент вариации (CV) для параллельных определений не должен был превышать 10%, а коэффициент детерминации (R^2) калибровочной кривой должен был быть $>0,99$.

Второй метод – определение активности протеаз по Фолину (на основе национального стандарта GBT 23527-2009 (Китай)). Это классический универсальный метод для определения активности протеаз различных классов в препаратах. Его принцип включал две стадии: 1) ферментативный гидролиз растворимого казеина в строго контролируемых условиях pH; и 2) колориметрическую реакцию продуктов гидролиза с реактивом Фолина при 680 нм. Условия проведения анализа варьировались в зависимости от оптимума активности фермента: для щелочных протеаз использовали боратный буфер, pH 10,5; для нейтральных – фосфатный буфер, pH 7,5; для кислых – лактатный буфер, pH 3,0. Инкубацию проводили при 40°C (для некоторых нейтральных – 30°C) в течение 10 мин. Реакцию останавливали трихлоруксусной кислотой. Единицей активности являлась условная единица (U) – количество фермента, которое за 1 минуту гидролизует казеин с образованием продуктов, эквивалентных 1 мкг тирозина. Метод требовал высокой чистоты реактивов. Константа K (светопоглощение, эквивалентное 1

мкг тирозина) должна была находиться в диапазоне 95–100. Допустимое расхождение между параллелями составляло не более 3%.

Третий метод это определение активности кислых и нейтральных протеаз в кормовых добавках. Это спектрофотометрический метод. Он аналогичен GBT 23527-2009, но специально адаптирован для анализа ферментных препаратов. За единицу активности (U) принимали количество фермента, которое за 1 мин при 40 °C и pH 3,0 (кислые протеазы) либо pH 7,2 (нейтральные) гидролизует казеин до 1 мкг тирозина. Пробоподготовка регламентирована детально: экстракция твёрдых форм (30 мин при 30 °C), серия рекомендуемых разбавлений. Для каждой новой партии реактива Фолина необходима свежая калибровочная кривая; $R^2 \geq 0,9978$. Валидационные параметры: предел количественного определения 500 U/г (мл), допустимое RSD $\leq 10,0$ %.

На основе проведённого анализа мы разработали интегрированные протоколы. Они объединяют достоинства рассмотренных методов и дополнены этапами, снижающими матричные эффекты и повышающими воспроизводимость. Определение кислых протеаз усовершенствовали по нескольким направлениям. Для комбикормов и премиксов ввели ступенчатую экстракцию: буферы с детергентами высвобождают фермент из матрицы полнее. Далее центрифугирование и фильтрация дают прозрачный экстракт. Второй элемент — калибровочная кривая по стандартному ферменту, внесённому в инертную модель целевой матрицы (например, низкопротеиновый корм). Это корректирует вклад компонентов корма в ферментативную реакцию и цветообразование. Для щелочных протеаз (pH > 9,0) основным приняли метод с окрашенным субстратом — специфичный и простой. Протокол дополнили валидацией извлечения для каждой новой партии матрицы (премикс, комбикорм), используя стандарт с известной активностью. Для нейтральных протеаз (pH 6,5–8,0) за основу взяли метод по Фолину. Оптимизировали состав и ионную силу фосфатного буфера (pH 7,5),

чтобы фермент оставался стабилен в течение анализа, а время инкубации унифицировали — 10 мин при 40 °С для всех образцов.

Была проведена стандартизация пробоподготовки: для всех типов матриц (препарат, премикс, комбикорм) разработали единую схему, включающую точное взвешивание, стандартизованные объемы экстрагирующего буфера, время и температуру экстракции, что позволило минимизировать операторную погрешность.

Таким образом, в результате проведенной работы были созданы валидированные методы, обеспечивающие точное и воспроизводимое определение протеолитической активности в широком спектре объектов.

Пример валидации методики определения активности протеазы: оценка показателей эффективности проводилась в ходе анализа серии измерений образцов для оценивания: контрольных образцов кормов, модельных смесей, растворов стандартных образцов исследуемых аналитов. Условия фотометрического определения: прибор – спектрофотометр UNICO 1201 (315-1000 нм); толщина просвечиваемого слоя и длина волны: кювета с толщиной просвечиваемого слоя 10,00 мм, $\lambda=415$ нм.

В таблице 3.1.1 показан расчет специфичности: цель испытания состояла в том, чтобы продемонстрировать, что метод специфичен и недвусмысленно, однозначно позволяет идентифицировать исследуемый аналит. Сущность заключалась в том, что протеаза высвобождала тирозин из субстрата. Оптическую плотность комплекса измеряли при длине волны 410 нм, выделившийся тирозин определяли при помощи градуировочной кривой, построенной на основе эталонных растворов тирозина. Для оценки специфичности были подготовлены 3 образца для оценивания с добавкой «мешающих факторов».

Приготовление образцов для оценивания с добавкой «мешающих» факторов: образец для оценивания № 1/1: в коническую колбу вместимостью 500 см³ к навеске контрольного образца корма массой 50 г добавили аликвоту 1 см³ раствора протеазы 25 ед./см³; образец для оценивания № 1/2: в

коническую колбу вместимостью 500 см³ к навеске контрольного образца корма массой 50 г добавили аликвоту 1 см³ раствора маннаназы концентрацией 0,9379·10⁻³ ед./см³; образец для оценивания № 1/3: в коническую колбу вместимостью 500 см³ к навеске контрольного образца корма массой 50 г добавили аликвоту 1 см³ раствора ксиланазы концентрацией 35 ед./см³. Получили испытуемые растворы с содержанием определяемого аналита. Специфичность рассчитывали по формуле:

$$\text{Специфичность} = \frac{|(A - B)|}{B} * 100$$

где А – Активность протеазы в контрольном образце; В – Активность протеазы в образце для оценивания. Критерий приемлемости: величина специфичности, полученной при анализе, не должна превышать 2%.

Таблица 3.1.1 Результаты измерений активности протеазы исследуемых аналитов

Активность протеазы в контрольном образце, А, ед./кг			
2444			
Номер образца для оценивания	Активность протеаза в испытуемом растворе, В, ед./кг	Специфичность, %	Вывод
1/1	2437	0,287	Приемлемо
1/2	2426	0,742	Приемлемо
1/3	2435	0,370	Приемлемо

В таблице 3.1.2, 3.1.3 и на рисунке 3.1.1 показан расчет линейности, которая была подтверждена путём изучения значений абсорбции эталонных растворов казеина. Концентрации модельных растворов казеина подобрали таким образом, чтобы они охватывали весь диапазон измерений. Аналитическая область соответствовала интервалу между верхним и нижним значением концентраций, выраженных в единицах измеряемых содержаний в матрице исследуемых проб и пропорциональных концентрациям аналитов в модельных растворах казеина. Полученные результаты оценивали методом

регрессионного анализа. Определили коэффициенты корреляции между абсорбцией и концентрацией казеина в растворе. Для этого приготовили исходный эталонный раствор казеина концентрацией 50 ммоль/дм³. Взвесили 0,5444 г высушенного казеина, количественно перенесли его в мерную колбу вместимостью 100 см³ и довели объём до метки ацетатным буфером концентрацией 0,25 моль/дм³, содержащим полисорбат 20 с массовой долей 0,01%. Затем исходный эталонный раствор казеина разбавили тем же буфером в соответствии с таблицей 3.1.2 для получения серии модельных растворов.

Таблица 3.1.2 Приготовление модельных растворов для расчета линейности

№ модельного раствора	Объем казеина, см ³	Объем буфера, см ³	Концентрация казеина ммоль/см ³
1	0,0	10,0	0
2	0,2	9,8	0,8
3	0,4	9,6	1,6
4	0,6	9,4	2,4
5	0,8	9,2	3,2

Коэффициент корреляции рассчитывается по формуле:

$$\frac{n \times \sum_i^n (c_i \times s_i) - \sum_i^n C_i \times \sum_i^n s_i}{\sqrt{[n \times \sum_i^n C_i^2 - (\sum_i^n C_i)^2] \times [n \times \sum_i^n S_i^2 - (\sum_i^n s_i)^2]}};$$

где r – коэффициент корреляции; S – высота пика исследуемого аналита на графическом отображении результатов измерения отдельного раствора; C – концентрация аналита в модельном растворе. Критерий приемлемости: коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99.

Таблица 3.1.3 Результат измерения отношения величины оптической плотности к содержанию казеина

Аналит	№ модельного раствора	Концентрация казеина в модельном растворе, мг/дм ³	Оптическая плотность модельного раствора	Соответствие концентрациям аналита в матрице исследуемых проб, аналитическая область, ед./кг
Активность протеазы	1	0,1	0,074	55
	2	0,8	0,341	585
	3	1,6	0,647	2216
	4	2,4	0,974	3346
	5	3,2	1,276	5501

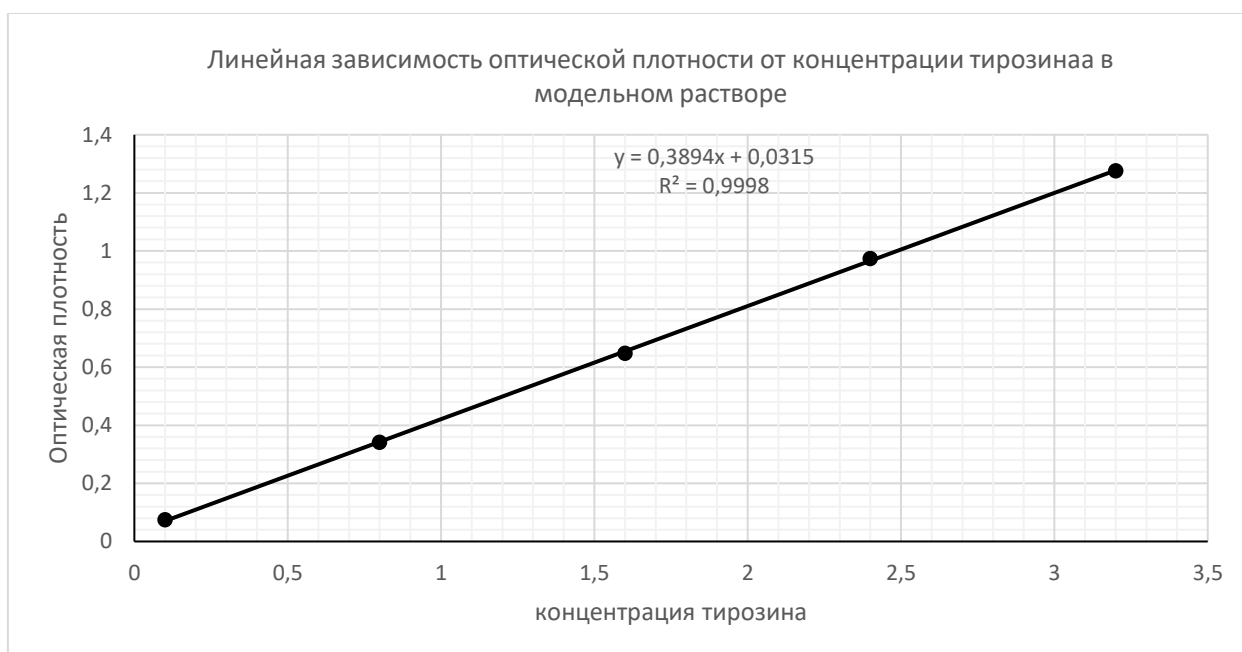


Рисунок 3.1.1 График линейной зависимости оптической плотности от концентрации казеина в модельном растворе

Значение коэффициентов корреляции линейных зависимостей оптической плотности от концентрации казеина в модельном растворе удовлетворяет требованиям критерия приемлемости ($r \geq 0,99$) и подтверждает линейную зависимость метода во всем диапазоне измерений.

В таблице 3.1.4 показан метод оценки правильности использовали метод добавки (метод «с добавкой») с расчётом степени извлечения (recovery) — это классический подход в аналитической химии для оценки правильности

(accuracy) и прецизионности метода анализа, особенно при работе со сложными матрицами. Для оценки правильности применен метод добавки образца с известным содержанием исследуемого аналита к матрице исследуемых проб. Для оценки правильности при исследовании кормов использовали метод добавки определенной аликвоты основного образца к исследуемой матрице. Для приготовления образца для оценивания №2/1 был взят образец корма ПК 5-1, не содержащий исследуемого аналита. К навеске образца корма массой 50,0 г была добавлена аликвота 1 см³ основного раствора с активностью протеаза 21,00 ед./см³. Активность исследуемого аналита в образце для оценивания: 420 ед./кг. Для приготовления образца для оценивания №2/2 был взят образец корма ПК 5-1, не содержащий исследуемого аналита. К навеске образца корма массой 50,0 г была добавлена аликвота 2 см³ основного раствора с активностью протеаза 21,00 ед./см³. Активность исследуемого аналита в образце для оценивания: 840 ед./кг. Для приготовления образца для оценивания №2/3 был взят образец корма ПК 5-1, не содержащий исследуемого аналита. К навеске образца корма массой 50,0 г была добавлена аликвота 3 см³ основного раствора с активностью протеазы 21,00 ед./см³. Активность исследуемого аналита в образце для оценивания: 1260 ед./кг. Для приготовления образца для оценивания №2/4 был взят образец корма ПК 5-1, не содержащий исследуемого аналита. К навеске образца корма массой 50,0 г была добавлена аликвота 4 см³ основного раствора с активностью протеаза 21,00 ед./см³. Активность исследуемого аналита в образце для оценивания: 1680 ед./кг. Для приготовления образца для оценивания №2/5 был взят образец корма ПК 5-1, не содержащий исследуемого аналита. К навеске образца корма массой 50,0 г была добавлена аликвота 5 см³ основного раствора с активностью протеаза 21,00 ед./см³. Активность исследуемого аналита в образце для оценивания: 2100 ед./кг.

Степень извлечения исследуемых аналитов из образца с добавкой определялась по формуле:

$$REC = \frac{x_D - x}{D} \times 100;$$

где X_D – содержание аналита в пробе с добавкой; X – содержание аналита в пробе без добавки; D – добавленное количество аналита; REC – степень извлечения добавленного аналита.

Критерий приемлемости: степень извлечения, добавленного аналита должна находиться в диапазоне от 95% до 105%.

Таблица 3.1.4 Результаты измерения степени извлечения протеазы

Исследуемый аналит в матрице	№ пробы с добавкой аналита	Активность аналита в пробе с добавкой, X_D	Активность аналита в пробе без добавки, X	Добавленное количество аналита, D	Степень извлечения добавленного аналита, REC , %
Активность протеаза в корме, ед./кг	2/1	415	0	420	98,8
	2/2	839	0	840	99,9
	2/3	1248	0	1260	99,0
	2/4	1698	0	1680	101,1
	2/5	2168	0	2100	103,2
Средняя степень извлечения добавленного аналита, %					100,4

В таблице 3.1.5 были приведены расчётные значения предела обнаружения и предела количественного определения. Степень извлечения аналита во всех пробах находилась в диапазоне от 95% до 105%, что удовлетворяло установленному критерию приемлемости. Средняя степень извлечения исследуемого аналита составила 100,4%, что свидетельствовало о незначительном смещении и подтверждало правильность метода.

Для экспериментального определения предела обнаружения и предела количественного определения был применён метод добавки стандартных образцов с известным содержанием исследуемого аналита к чистой матрице исследуемых проб. Содержание аналитов в образцах выбрали таким

образом, чтобы оно находилось на уровне, близком к предполагаемому пределу обнаружения. Приготовили 10 образцов для оценивания методом внесения раствора стандартного образца в навески корма ПК 5-1, не содержащего исследуемый аналит. Для этого к навескам корма массой ~50 г добавили аликвоту 0,1 см³ основного раствора протеазы с активностью 21,00 ед./см³. Расчётная активность исследуемого аналита в образце для оценивания составила 42 ед./кг. Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) рассчитывали по формулам:

$$S_0 = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n\bar{x}^2}{n-1}}, s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}}; \text{ПО} = s'_0 \times 3; \text{ПКО} = s'_0 \times 10 ;$$

где S_0 – стандартное отклонение результатов измерения; s'_0 – стандартное отклонение, используемое для расчета ПО и ПКО; n – число измерений ОО в условиях повторяемости.

Таблица 3.1.5 Предел обнаружения и предел количественного определения

Исследуемый аналит	Содержание аналита в образце, ед./кг	Стандартное отклонение результатов измерений, S_0	Стандартное отклонение для расчета ПО и ПКО, s'_0	Предел обнаружения, ПО	Предел количественного определения, ПКО
Активность протеаза в корме, ед./кг	31	7,8	5,5	16,6	55,2
	36				
	37				
	51				
	54				
	41				
	49				
	36				
	49				
	46				

В таблице 3.1.6 представлены результаты оценки повторяемости, которую проводили на основе серии из 6 результатов, полученных в

одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени. Для оценки повторяемости использовали контрольный образец корма для птицы. Отобрали 6 навесок пробы массой по 50 г. Расчет повторяемости проводили по формуле:

$$s_r = \frac{\sqrt{\frac{\sum_i^n x_i^2 - n\bar{x}^2}{n-1}}}{\bar{x}^2} \times 100 ;$$

где n – объем серии измерений (n= 6); X – содержание аналита в образце; $\bar{X}$ - среднее содержание аналита в серии измерений; S_r – относительное стандартное отклонение повторяемости. Предел повторяемости рассчитывают по формуле:

$$r = 2,8 \times S_r;$$

где S_r – относительное стандартное отклонение повторяемости; r – предел повторяемости, %.

Таблица 3.1.6 Относительное стандартное отклонение повторяемости

Исследуемый аналит	Результаты параллельных определений содержания исследуемого аналита в образце						Относительное стандартное отклонение повторяемости, %	Предел повторяемости, %
	X1	X2	X3	X4	X5	X6		
Активность протеазы, ед./кг	2496	2401	2457	2548	2444	2470	2,0	5,6

В таблице 3.1.7 показан расчет относительного стандартного отклонения внутрилабораторной прецизионности. Оценку внутрилабораторной прецизионности метода проводили на основе серии 20 результатов измерений контрольного образца корма для птицы, полученные в условиях внутрилабораторной промежуточной прецизионности при вариации различных факторов (разные операторы, разное время, разные партии реактивов одного типа, разные наборы мерной посуды и т. д.).

Таблица 3.1.7 Относительное стандартное отклонение
внутрилабораторной прецизионности

№ измерения	Содержание исследуемого аналита	
	Активность протеазы	
	$\bar{X}$, ед./кг	$\bar{\bar{X}}$, ед./кг
1	2434	2453
2	2468	
3	2475	
4	2450	
5	2338	
6	2416	
7	2442	
8	2481	
9	2519	
10	2441	
11	2436	
12	2517	
13	2476	
14	2447	
15	2364	
16	2429	
17	2470	
18	2449	
19	2509	
20	2499	
Относительное стандартное отклонение внутрилабораторной прецизионности, SRw, %	1,9	
Предел внутрилабораторной прецизионности, Rw, %	5,2	

Расчет прецизионности метода проводили по формуле:

$$S_{Rw} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_i^n \bar{x}^2 - n\bar{\bar{x}}^2}{n-1}}}{\bar{\bar{x}}} \times 100 ;$$

где n – объем серии измерений (n= 20); $\bar{X}$ - содержание аналита в образце, полученное в контрольном измерении; $\bar{\bar{X}}$ - среднее содержание аналита в серии измерений контрольного образца; SRw – относительное стандартное отклонение внутрилабораторной прецизионности.

Предел внутрилабораторной прецизионности рассчитывали по формуле:

$$Rw = 2,8 \times S_{Rw} ;$$

где S_{Rw} – относительное стандартное отклонение внутрилабораторной прецизионности; Rw – предел внутрилабораторной прецизионности, %.

Для оценки внутрилабораторной прецизионности был взят контрольный образец корма для птицы. При анализе образца были соблюдены условия внутрилабораторной промежуточной прецизионности (разные операторы, разное время, разные партии реактивов одного типа, разные наборы мерной посуды и т. д.). Оценку относительной стандартной неопределенности проводили на основе расширения значения относительного стандартного отклонения внутрилабораторной прецизионности, оцененного в условиях максимальной вариативности условий, влияющих на измерения, с использованием эмпирического коэффициента, характерного для химической области выполнения измерений равного 2. Расчет относительной стандартной неопределенности проводили по формуле:

$$u = 2SR_w ;$$

где S_{Rw} – относительное стандартное отклонение внутрилабораторной прецизионности; u – относительная стандартная неопределенность.

В таблице 3.1.8 проводили оценку относительной расширенной неопределенности проводили на основе значения относительной стандартной неопределенности, умноженной на коэффициент охвата $k=2$, для доверительной вероятности $P=0,95$. Расчет относительной расширенной неопределенности проводили по формуле:

$$U = u \times k;$$

где u – относительная стандартная неопределенность; k – коэффициент охвата ($k=2$); U – относительная расширенная неопределенность.

Таблица 3.1.8 Неопределенность измерений

Исследуемый анализ	Активность
Относительная стандартная неопределенность, u , %	3,8
Относительная расширенная неопределенность, U , %	7,6

Результаты оцененных показателей эффективности и интерпретация результатов представлены в таблице 3.1.9.

Таблица 3.1.9 Итоговая таблица валидации активности протеазы

Валидационный параметр	Критерий	Полученный результат
Специфичность	Демонстрация способности однозначно идентифицировать определяемый анализ. Величина специфичности, полученной при анализе, не должна превышать 5%	Интерференция отсутствует, специфичность не превышает 5%
Линейность	Демонстрация линейности метода во всем диапазоне аналитической области. Коэффициент корреляции не менее 0,99 для шести стандартных растворов во всем диапазоне измеряемых концентраций	Метод линеен во всем диапазоне измеряемых концентраций, коэффициент корреляции = 0,9988
Аналитическая область	Соответствует диапазон измеряемых содержаний (концентраций) анализа в матрице исследуемых проб, соответствующий нижнему и верхнему значению концентраций линейного диапазона с учетом разбавлений	От 55,2 до 5501 ед./кг
Правильность	Степень извлечения добавленного анализа (REC) должна находиться в диапазоне от 95% до 105%	REC= 100,4%
Предел обнаружения	Наименьшее количество (концентрация) определяемого анализа в образце, которое может быть обнаружено (или приближенно оценено)	ПО = 16,6 ед./кг
Предел количественного определения	Наименьшее количество (концентрация) анализа в образце, которое может быть количественно оценено с доверительной вероятностью 95%	ПКО = 55,2 ед./кг
Повторяемость	Оценка повторяемости на основе серии 6 результатов измерений, полученных в условиях повторяемости	$S_r = 2,0\%$ ($n=6$); $r = 5,6\%$
Прецизионность	Оценка прецизионности на основе серии 20 результатов измерений, полученных в условиях внутрилабораторной промежуточной прецизионности при вариации различных факторов	$S_{Rw} = 1,9\%$ ($n=20$); $Rw = 5,2\%$
Неопределенность	Оценка неопределенности на основе расширения значения относительного стандартного отклонения внутрилабораторной прецизионности	$u = 3,8\%$; $U = 7,6\%$

Таким образом, в результате проведённой работы была успешно решена задача разработки, усовершенствование затронуло несколько критических этапов. Для кислых протеаз (метод по Фолину) внедрили ступенчатую процедуру экстракции из сложных матриц с детергентами. Также ввели обязательный контроль матричных эффектов. Для этого строят калибровочные кривые в инертной модели корма. Для щелочных протеаз выбрали специфичный метод с окрашенным субстратом. Его дополнили процедурой валидации извлечения для каждой партии матрицы. Для нейтральных протеаз оптимизировали состав буфера и унифицировали время инкубации. Для всех методов стандартизировали пробоподготовку. Это минимизировало операторную погрешность.

Комплексная валидация разработанного метода определения активности протеазы проводилась на модели кормовой матрицы. Она подтвердила, что метод соответствует установленным критериям пригодности для целевого применения. Ключевые валидационные параметры показывают высокое качество метода. Специфичность подтверждена. Наличие потенциально мешающих ферментов (маннаназы, ксиланазы) не оказывало значимого влияния на результат определения протеазы. Величина специфичности не превышала 0,75 % при критерии ≤ 5 %. Линейность сохраняется во всём рабочем диапазоне (55-5501 ед./кг). Это подтверждается высоким коэффициентом корреляции ($r = 0,9988$). Правильность оценивали методом добавок, и в среднем она составила 100 % ($REC = 98,8-103,2$ %). Это указывает на отсутствие систематической погрешности. Чувствительность метода характеризуется низким пределом обнаружения 16,6 ед./кг и пределом количественного определения 55,2 ед./кг. Это позволяет надёжно определять как следовые, так и рабочие количества фермента в кормах. Прецизионность метода на высоком уровне. Относительное стандартное отклонение повторяемости (Sr) составило 2,0 %, а внутрилабораторной прецизионности (SRw) 1,9 %. Это свидетельствует о высокой воспроизводимости результатов как в условиях повторяемости, так и при варьировании факторов (оператор,

время, партии реактивов). Расширенная неопределённость измерений установлена в 7,6 % при $k = 2$ и $P = 0,95$. Это приемлемое значение для методов ферментативного анализа в сложных матрицах.

Таким образом, разработанные и валидированные методы обеспечивают точное, воспроизводимое и специфичное определение активности кислых, нейтральных и щелочных протеаз в широком спектре объектов

3.2. Применение разных методов и подходов для оценки переваримости сухого вещества, сырого протеина мясокостной и перьевой муки *in vitro*

В качестве основного метода-прототипа для оценки переваримости перьевой муки выбрали регламентированный ГОСТ Р 55987-2014. Этот стандарт устанавливает одноэтапную процедуру. Она моделирует только желудочную фазу пищеварения, но в усиленных условиях. Суть метода в продолжительной инкубации обезжиренной и высушенной пробы кормовой муки в растворе пепсина. Пепсин готовят на разбавленной соляной кислоте. После инкубации отделяют и количественно анализируют негидролизированный остаток. Ключевые условия анализа строго нормированы. Инкубация идёт в 0,2 % растворе пепсина, приготовленном на 0,075 М HCl. Температура $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Продолжительность 16 часов при постоянном перемешивании до 50 об/мин. Используют пепсин свиного происхождения с активностью 320-1000 ед. (УФ)/мг. Единица активности определена как увеличение УФ-поглощения при 280 нм на 0,001 ед. оптической плотности в минуту при гидролизе гемоглобина при $37 ^\circ\text{C}$ и pH 2,0. Подготовка пробы включает размол до частиц $\leq 0,85$ мм. Также обязательно обезжиривание диэтиловым эфиром при массовой доле жира >10 %. Приготовление рабочего раствора соляной кислоты требует точного дозирования в зависимости от плотности исходной кислоты, как представлено в таблице 3.2.1. стандарта: после инкубации суспензию фильтруют через предварительно высушенный и взвешенный фильтр. Нерастворимый остаток промывают, высушивают при $(105 \pm 2) ^\circ\text{C}$ до

постоянной массы и взвешивают, переваримость протеина определяют, дополнительно измеряя массовую долю азота по Кьельдалю в исходной пробе и в негидролизованном остатке. Метрологические характеристики метода, установленные стандартом, приведены в таблице 3.2.1.

Таблица 3.2.1 — Показатели прецизионности метода определения переваримости сухого вещества кормовой муки и протеина кормовой муки *in vitro* согласно ГОСТ Р 55987-2014

Наименование показателя	Переваримость	
	Сухого вещества	Протеина
Границы абсолютной погрешности $\pm A$, %, $P=0,95$	$\pm 2,9$	$\pm 2,1$
Предел повторяемости r , %, $P=0,95$	2,0	1,5
Предел воспроизводимости R , %, $P=0,95$	4,0	3,0

Данный метод, будучи стандартизированным, обеспечивает воспроизводимость и сопоставимость результатов для перьевой муки. Однако, его ключевым диагностированным ограничением является узкая область применения (только гидролизованное перо) и моделирование лишь желудочного пищеварения, это может недостаточно полно отражать потенциал полного кишечного гидролиза, особенно для мясокостной муки, содержащей значительное количество коллагена, для расщепления которого необходим синергизм пепсина и панкреатических коллагеназ.

Для создания более физиологически адекватной модели был рассмотрен второй метод – двухэтапный последовательный пепсино-панкреатиновый гидролиз (на основе подхода Boisen & Fernández, 1997). Его принцип заключается в последовательной инкубации пробы сначала в растворе пепсина при кислотном pH (1,5–2,0), имитируя условия желудка, а затем, после нейтрализации, в растворе панкреатина при pH 6,8–7,5, для моделирования условий тонкого кишечника, этот метод применим для широкого спектра кормов, но требует оптимизации условий для каждого типа сырья.

Третий рассматриваемый подход – методы с предварительной химической или ферментативной обработкой субстрата, для нативных структурных белков (кератин, коллаген) в литературе описаны протоколы, включающие этап предварительной денатурации или расщепления поперечных сшивок для разрыва дисульфидных мостиков в кератине. Такие методы позволяют оценить потенциальную переваримость после преодоления первичного структурного барьера. Валидация модифицированного метода оценки переваримости протеина проводилась на модельных образцах. Правильность оценивали методом добавок легкоусвояемого казеина (10–30% от массы белка), Средний процент восстановления (recovery) составил 98,5–102,5%. Прецизионность оценивали в условиях повторяемости (6 параллелей) и внутрилабораторной прецизионности (20 определений разными операторами в разные дни), относительное стандартное отклонение повторяемости составило 1,8%, а внутрилабораторной прецизионности – 2,5%, совокупная стандартная неопределенность, рассчитанная с учетом вкладов взвешивания, измерения объемов, определения азота и прецизионности, при коэффициенте охвата $k=2$ дала расширенную неопределенность (U) $\pm 3,5\%$ для значения переваримости протеина. Критический разбор национального стандарта и его последующая модификация дали методику *in vitro* оценки переваримости труднорастворимых кормовых продуктов животного происхождения. Двухэтапный гидролиз и предварительная обработка, применяемая при необходимости, распространяют метод на мясокостную муку и приближают модель к физиологическим условиям. Валидационные испытания показали удовлетворительную правильность, высокую прецизионность и приемлемую неопределенность. Методику можно рекомендовать для исследовательской практики и промышленного контроля качества сырья.

Чтобы проверить это на практике, мы провели сравнительное исследование образцов мясокостной муки от разных коммерческих производителей, представленных на российском рынке. Такая работа

показала, как метод ведет себя в рутинном анализе, и дала объективные сравнительные данные о питательном потенциале сырья из разных источников. Для составления рационов это имеет прямое значение. Эксперименты по определению переваримости сырого протеина и сухого вещества выполняли в аналитической лаборатории Научно-исследовательского центра (НИЦ) Группы Компаний «Черкизово».

Анализы выполняли по адаптированному двухэтапному протоколу. Желудочную фазу моделировали инкубацией с пепсином при 45 °С в течение 16 ч, кишечную — с панкреатином при pH 7,5 и 37 °С в течение 18 ч. Каждый образец ставили в трёх параллельных повторностях; это дало статистическую надёжность. Данные обработали, рассчитав средние арифметические и стандартные отклонения. В таблице 3.2.2 сведены результаты сравнительного анализа. По каждому образцу мясокостной муки приведены содержание сырого протеина и сырого жира — показатели, по которым судят о качестве сырья, — а также переваримость сырого протеина (ПП, %) и сухого вещества (ПСВ, %) с характеристиками вариабельности. Таблица отражает разброс питательной ценности коммерческой мясокостной муки и помогает выявить образцы с наибольшим потенциалом усвоения. Затем мы продолжили исследования по оценке питательного потенциала разных кормовых ингредиентов. Разработанный двухэтапный метод *in vitro* применили для сравнительного анализа образцов кормовой муки растительного происхождения от ряда ведущих отечественных производителей. Целью было оценить вариабельность доступности питательных веществ в этом виде сырья. Также мы хотели на практике проверить применимость методики к матрицам с другим химическим составом и структурой, чем у продуктов животного происхождения.

Таблица 3.2.2 Определения переваримости сухого вещества и протеина кормовой мясокостной муки *in vitro* согласно ГОСТ Р 55987-2014

Наименование показателя	Переваримость	
	Сухого вещества*	Сырого протеина**
МКМ Проба 1	93,2	90,5
МКМ Проба 2	91,9	89,0
МКМ Проба 3	90,2	89,8
МКМ Проба 4	87,9	88,2
МКМ Проба 5	90,1	89,7
МКМ Проба 6	87,5	90,0
МКМ Проба 7	88,4	89,9
МКМ Проба 8	87,8	88,6
МКМ Проба 9	89,0	91,6
МКМ Проба 10	91,6	93,4
МКМ Проба 11	88,9	91,9
МКМ Проба 12	88,8	92,1
МКМ Проба 13	91,9	93,6
МКМ Проба 14	88,5	93,8
МКМ Проба 15	90,8	93,7
МКМ Проба 16	86,7	89,3
МКМ Проба 17	86,7	89,9
МКМ Проба 18	87,8	91,3
Коэффициент корреляции	0,348	
Коэффициент детерминации, %	12,13	

* Границы абсолютной погрешности, переваримости сухого вещества Δ , 2,9 %; *

* * Границы абсолютной погрешности, переваримости сырого протеина Δ , 2,1 %

Экспериментальную работу по определению переваримости сырого протеина и сухого вещества кормовой муки выполняли в лаборатории Научно-исследовательского центра ГК «Черкизово». Анализ шёл по валидированному протоколу последовательного ферментативного гидролиза. Протокол включал

инкубацию с пепсином (0,2 % раствор в 0,075 М HCl, 45 °С, 16 часов). Затем следовала нейтрализация и обработка панкреатином (рН 7,5, 37 °С, 18 часов). Чтобы результаты были достоверными, каждый образец анализировали в трёх повторностях. Полученные данные статистически обработали. Рассчитывали среднее арифметическое значение и стандартное отклонение. Результаты сравнительной оценки образцов муки представлены в таблице 3.2.3.

В таблицу вошли содержание сырого протеина и сырого жира в исходном сырье, а также рассчитанные значения переваримости сырого протеина (ПП, %) и сухого вещества (ПСВ, %). Данные охватывают диапазон питательной ценности коммерческих образцов кормовой муки и позволяют отобрать пробы с наибольшим потенциалом усвоения питательных веществ.

Сопоставление таблиц 3.2.2 и 3.2.3 выявляет существенные различия в характере связи между переваримостью сухого вещества и сырого протеина для мясокостной (МКМ) и перьевой муки. У МКМ коэффициент корреляции равен 0,348 — связь слабая положительная. Низкий коэффициент детерминации (12,13 %) это подтверждает.

Он означает, что лишь около 12 % вариации переваримости протеина объясняется изменчивостью переваримости сухого вещества. Значения переваримости по обеим характеристикам в МКМ стабильно высоки. Они находятся в диапазонах 86,7-93,2 % и 88,2-93,8 % соответственно. Разброс при этом незначительный. Такая слабая корреляция может объясняться относительной однородностью и стабильностью состава МКМ, где высокий и постоянный уровень протеиновой переваримости в значительной степени достигается независимо от несущественных колебаний в усвояемости сухой материи. В противоположность этому, для перьевой муки наблюдается исключительно сильная положительная корреляция между показателями, о чем свидетельствует коэффициент 0,958.

Таблица 3.2.3 Определения переваримости сухого вещества и протеина перьевой муки *in vitro* согласно ГОСТ Р 55987-2014

Наименование показателя	Переваримость	
	Сухого вещества*	Сырого протеина**
Перьевая мука проба 1	20,3	28,7
Перьевая мука проба 2	29,6	34,7
Перьевая мука проба 3	28,2	23,9
Перьевая мука проба 4	45,1	54,5
Перьевая мука проба 5	52,5	60,1
Перьевая мука проба 6	52,5	59,3
Перьевая мука проба 7	64,7	68,6
Перьевая мука проба 8	71,7	70,8
Перьевая мука проба 9	66,6	66,4
Перьевая мука проба 10	58,1	62,5
Перьевая мука проба 11	57,1	64,4
Перьевая мука проба 12	64,4	66,3
Перьевая мука проба 13	76,7	66,3
Перьевая мука проба 14	64,6	67,8
Перьевая мука проба 15	53,2	59,2
Перьевая мука проба 16	82,1	80,7
Перьевая мука проба 17	77,0	76,4
Перьевая мука проба 18	53,9	56,2
Коэффициент корреляции	0,958	
Коэффициент детерминации, %	91,79	

: * Границы абсолютной погрешности, переваримости сухого вещества Δ , 2,9 %; *

* * Границы абсолютной погрешности, переваримости сырого протеина Δ , 2,1

Коэффициент детерминации (91,79%) указывает, что почти 92% изменчивости в переваримости протеина напрямую связано с изменениями в переваримости сухого вещества. Данные по перьевой муке имеют значительно более широкий разброс значений (20,3–82,1% для сухого вещества и 23,9–80,7% для протеина), которые при этом демонстрируют четкую синхронную динамику роста или снижения от пробы к пробе. Это позволяет предположить, что основной фактор, определяющий питательную ценность перьевой муки

(например, степень и эффективность гидролитической обработки, разрушающей жесткие кератиновые структуры пера), одновременно и в равной мере влияет на усвояемость как органической массы в целом, так и протеина в частности.

Итак, мы установили, что коэффициент корреляции между переваримостью сухого вещества и сырого протеина в мясокостной муке ($r = 0,348$) статистически незначим. Он существенно ниже, чем в перьевой муке ($r = 0,958$). Это различие объясняется технологическими и сырьевыми факторами. В мясокостной муке состав стабилен, а питательные вещества изначально доступны хорошо. Поэтому изучаемые параметры варьируют независимо друг от друга. Питательная ценность перьевой муки определяется прежде всего эффективностью гидролиза. А гидролиз синхронно влияет и на переваримость сухой массы, и на переваримость протеина. Так между ними формируется сильная прямая зависимость.

Дальше мы сравнили эффективность разных *in vitro* методов определения переваримости. Для этого провели исследование с тремя аналитическими подходами. Первый это регламентированный ГОСТ Р 55987-2014, то есть одноэтапный пепсиновый гидролиз. Второй это метод Бойзена (Boisen & Fernández, 1997) с укороченной желудочной фазой и оригинальным двухэтапным протоколом. Третий вариант — та же методика с переработанными временными параметрами инкубации. В таблице 3.2.4 сведены результаты определения переваримости сухого вещества и сырого протеина для широкого набора кормовых продуктов животного происхождения, полученные с применением этих методов.

Таблица 3.2.4 – Сравнительная оценка переваримости сухого вещества и сырого протеина различными *in vitro* методами

Матрица	ГОСТ 55987-2014		Метод Бойзена (Boisen & Fernandez, 1997;	модифицированный метод Бойзена (Boisen)	
	Метод 1: пепсин 16 ч		Метод 2: пепсин 3 ч + панкреатин 24 ч	Метод 3: пепсин 6 ч + панкреатин 18 ч	
	Сухого веществ а	Перевариваемость белка/протеина			
Мука из крови	94,4	94,2	84,70	85,50	
Мука свиная мясокостная	69,5	70,1	92,70	94,90	
Мука куриная мясокостная	65,7	66,1	90,00	90,80	
Мука перьевая	45,1	54,5	73,40	75,40	
Мука перьевая	52,5	59,3	72,3	77,1	
Мука перьевая	64,7	68,6	71,3	74,4	
Мука перьевая	66,6	66,4	71,2	74,2	
Мука перьевая	62,2	64,0	68,5	71,8	
Мука перьевая	58,1	62,5	69,4	72,1	
Мука перьевая гидролиз.	73,1	73,7	83,4	85,8	
Разность переваримости протеина, %					
Абс. разность (M1→M2)	Относительная разность (M1→M2),	Абс. разность (M1→M3)	Относительная разность (M1→M3),	Абс. разность (M2→M3)	Относительная разность (M2→M3),
-9,50	-10,08	-8,70	-9,24	0,80	0,94
22,60	32,24	24,80	35,38	2,20	2,37
23,90	36,16	24,70	37,37	0,80	0,89
18,90	34,68	20,90	38,35	2,00	2,72
13,00	21,92	17,80	30,02	4,80	6,64
2,70	3,94	5,80	8,45	3,10	4,35
4,80	7,23	7,80	11,75	3,00	4,21
4,50	7,03	7,80	12,19	3,30	4,82
6,90	11,04	9,60	15,36	2,70	3,89
9,70	13,16	12,10	16,42%	2,40	2,88

Согласно таблице 3.2.4, одноэтапный метод (ГОСТ Р 55987-2014) дает заметно заниженные значения переваримости протеина для нативных и труднорасщепляемых субстратов — мясокостной и перьевой муки — на фоне методов со стадией панкреатинowego гидролиза. Иная картина для высокогидролизованного продукта: на муке из крови одноэтапный метод завышает результат. Это говорит об ограниченной применимости такого

подхода, когда нужно оценить полную физиологическую переваримость. Модифицированный метод Бойзена (пепсин 6 ч + панкреатин 18 ч) в большинстве случаев дает значения, сопоставимые с оригинальным методом Бойзена или незначительно их превышающие, что подтверждает его адекватность и воспроизводимость.

Согласованность результатов модифицированного метода Бойзена с оригинальной методикой проверили отдельно. Одновременно оценили, укладываются ли расхождения в установленную расширенную неопределенность ($U = 2\%$). Итоги сравнительного анализа сведены в таблице 3.2.5: абсолютные разности между методами и их соответствие диапазону допустимых значений.

Таблица 3.2.5 – Анализ согласованности результатов модифицированного метода Бойзена и оригинального метода Бойзена с учётом расширенной неопределенности

Матрица	Метод 1*	Метод 2**	абс. разность	Диапазон по методике (6\18 часов) $U=2\%$			Результат ***
Мука из крови	85,50	84,70	0,80	83,4	86,8	$83,4 < 84,7 < 86,8$	ОК
Мука мясная свиная	94,90	92,70	2,20	91,9	95,7	$91,9 < 92,7 < 95,7$	ОК
Мука куриная	90,80	90,00	0,80	88,6	92,2	$88,6 < 90,0 < 92,2$	ОК
Мука перьевая	87,20	73,40	13,80	78,7	81,9	$78,7 > 81,9$	not ok

* Модифицированный метод Бойзена (Boisen);

** Классический метод Бойзена (Boisen & Fernandez, 1997; разница с учетом по методике (6/18 часов $U=2\%$))

Для большинства исследованных образцов — муки из крови, свиной и куриной мясокостной муки — абсолютная разница между результатами модифицированного и оригинального метода Бойзена не превышает 2,2 % (табл. 3.2.5). Она укладывается в диапазон, который определяется расширенной неопределённостью ($\pm 2\%$). Это говорит о хорошей согласованности методов для данных типов сырья. Но для образца перьевой муки расхождение существенное. Оно выходит за пределы установленного диапазона. Значит, для этой специфической матрицы с высоким содержанием

кератина нужна дополнительная валидация и, возможно, дальнейшая оптимизация протокола.

На основании проведенных исследований можно заключить следующее. Классический одноэтапный метод (ГОСТ Р 55987-2014) для оценки переваримости белкового сырья имеет существенные ограничения. Особенно это касается структурно сложного сырья, такого как мясокостная и перьевая мука. Ограничения связаны с отсутствием моделирования кишечной фазы пищеварения. Из-за этого показатели переваримости значительно занижаются. А значит, объективно оценить питательный потенциал такого вида кормов не получается. Поэтому мы разработали и адаптировали двухэтапный метод последовательного ферментативного гидролиза. Он основан на принципах подхода Boisen & Fernández. Метод включает симуляцию не только желудочного, но и кишечного этапа переваривания. Для этого проводят инкубацию с пепсином и панкреатином. Валидация модифицированного протокола подтвердила его высокую точность и воспроизводимость. Метод характеризуется удовлетворительной правильностью, которую доказали методом добавок. Метод также демонстрирует высокую прецизионность в условиях повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости при приемлемой расширенной неопределенности. Практическое применение для сравнительного анализа широкого спектра коммерческих образцов животного и растительного сырья подтвердило его эффективность и информативность: удалось выявить значительную вариабельность переваримости между партиями и производителями. Внедрение двухэтапного подхода, таким образом, существенно повышает физиологическую достоверность оценки *in vitro* и дает надежный инструмент для более точного прогнозирования питательной ценности кормов — как в научных исследованиях, так и при промышленном контроле качества.

3.3 Использование различных уровней протеаз в кормлении цыплят-бройлеров

На этом этапе мы сравнили, как разные типы и уровни экзогенных протеаз влияют на продуктивные показатели и эффективность использования корма у цыплят-бройлеров при включении в рацион мясокостной муки (МКМ). Опыт был проведен на базе вивария Волгоградского государственного аграрного университета на 525 суточных цыплятах-бройлерах кросса «Ross 308». Птица методом полной рандомизации была разделена на 5 групп по 105 голов в каждой, для обеспечения статистической достоверности каждая группа была подразделена на 3 повторности по 35 голов, размещенные в отдельных секциях, Условия содержания (температурный и световой режим) соответствовали принятым технологическим нормативам. Были сформированы следующие опытные группы: контроль (базовый рацион без протеаз); группа I (базовый рацион + протеаза Кемзайм 200 г/т); группа II (базовый рацион + протеаза Стеллар про (Lonct), 200 г/т); группа III (базовый рацион + комбинация протеаз Кемзайм и Стеллар про (Lonct) по 200 г/т каждой, суммарно 400 г/т); группа IV (базовый рацион + комбинация тех же протеаз по 250 г/т каждой, суммарно 500 г/т), Основу трехфазного рациона для всех групп составляли пшеница и соевый шрот с включением 5-7,5% мясокостной муки, Кормление осуществлялось вволю гранулированным комбикормом, На протяжении 40-дневного опыта учитывали сохранность, потребление корма и динамику живой массы.

Результаты исследований представлены в таблице 3.3.1, введение протеаз оказало существенное положительное влияние на продуктивность, все опытные группы превосходили контроль по конечной живой массе, наибольший суммарный привес (3116 г) был отмечен в группе IV с комбинацией протеаз в дозе 500 г/т, что на 176 г превысило показатель контроля (2940 г), группа III (комбинация, 400 г/т) также показала высокий результат – 3089 г, группы на монопрепаратах имели прирост 3014 г и 3036 г, аналогичная тенденция наблюдалась по затратам корма (FCR), наилучшая эффективность

использования корма была достигнута в группах с комбинированными протеазами: FCR составил 1,521 и 1,501 г/г в группах III и IV соответственно, против 1,666 г/г в контроле, Улучшение FCR было обеспечено как за счет увеличения привесов, так и за счет снижения общего потребления корма на 199-221 г. Важно отметить, что положительный эффект протеаз усиливался к финальной фазе откорма, когда уровень МКМ в рационе был максимальным, что указывает на целенаправленное действие ферментов на белки животного происхождения.

Таблица 3.3.1 – Влияние различных типов и доз экзогенных протеаз на продуктивность цыплят-бройлеров за периоды выращивания

Показатели	Контроль	Опытная группа I	Опытная группа II	Опытная группа III	Опытная группа IV
Производитель		Кемзайм	Стеллар про (Lonct)	Кемзайм + Стеллар про (Lonct)	Кемзайм + Стеллар про (Lonct)
Протеазы, г/т	0	200	200	200 + 200 = 400	250 + 250 = 500
Рост, г \ сутки					
1 – 8	155	156	152	160	164
9 -19	620	653	658	680	694
20 - 35	1671	1680	1686	1690	1698
36 - 40	494	525	540	559	560
За весь период	2940	3014	3036	3089	3116
Среднесуточный прирост, г					
За весь период	73,5	75,4	75,9	77,2	77,9
Потребление корма, г					
1 – 8	185	170	170	175	175
9 -19	862	839	854	857	850
20 - 35	2900	2896	2806	2796	2783
36 - 40	950	900	885	870	868
За весь период	4897	4805	4715	4698	4676
Затраты корма, г/г (FCR)					
За весь период	1,666	1,595	1,553	1,521	1,501

Расчёт среднесуточного прироста подтвердил преимущество комбинированного применения протеаз. В контрольной группе среднесуточный прирост составил 73,5 г, в опытных группах он увеличился до 75,4–77,9 г. Максимальное значение достигнуто в группе IV (77,9 г), что на 6,0% выше контроля. Такая динамика согласуется с изменениями живой массы и конверсии корма. Она подтверждает, что совместное применение ферментов

разного происхождения эффективно. Максимальное значение получили в группе IV. Там комбинировали протеазы в дозе 500 г/т. Полученные данные показывают синергетический эффект комбинированных протеаз. Поэтому эту схему можно рекомендовать для повышения эффективности использования местных белковых ресурсов в промышленном птицеводстве.

3.4. Подходы к балансированию низкопротеиновых растительных рационов бройлеров кристаллическими аминокислотами для повышения продуктивности цыплят бройлеров

В литературе по низкобелковым рационам для бройлеров есть данные, что кристаллические аминокислоты позволяют безопасно снизить содержание сырого протеина (СП) в рационе на старте и росте примерно на 10-16 %.

В таблице 3.4.1 приведены рецепты растительных комбикормов с разным уровнем сырого протеина для бройлеров на фазах старта и роста. Контрольный рацион содержит оптимальный протеин (21 % и 19 %). В двух опытных группах его уровень ниже на 2-2,5 % за счёт уменьшения доли соевого шрота. Дефицит аминокислот в опытных рационах компенсировали повышенным введением кристаллических лизина, метионина, треонина, валина и изолейцина. За счет этого удавалось удерживать контрольные нормы или даже превышать их. Во второй опытной группе дозу комплекса протеаз увеличили до 500 г/т против 400 г/т в первой. Все рационы сбалансированы по макроэлементам — перед нами два современных подхода к низкопротеиновому питанию: прецизионная балансировка синтетическими аминокислотами и ее сочетание с ферментными препаратами.

Анализ рецептур показывает: в опытных группах уровень СП снижали на 2,0 процентных пункта на старте (с 21 % до 19 %) и на 1,5 п.п. на росте (с 19 % до 17,5 %) относительно контроля. В относительном выражении это 9,5 % и 7,9 %. Дефицит компенсировали кристаллическими аминокислотами (КА). Такое снижение укладывается в безопасный предел, который рекомендуют современные исследования (10–16 % для бройлеров), и

считается умеренным. Согласно принципам кормления Ross, значим не общий уровень СП, а точный баланс доступных незаменимых аминокислот относительно лизина.

В опытных рационах, несмотря на снижение СП, уровни критически важных аминокислот (лизин, метионин+цистин, треонин) поддерживаются на уровне или превышают контроль, что полностью соответствует стратегии прецизионного аминокислотного питания.

Таблица 3.4.1. Рецепты растительных (вегетарианских) комбикормов в контрольной и опытной группах с разным уровнем сырого протеина, аминокислот и ферментов

Наименование	Старт к	Рост к	Финиш к	Старт I	Рост I	Финиш I	Старт II	Рост II	Финиш II
Пшеница	15,00%	19,56%	40,00%	14,96%	19,52%	40,00%	14,95%	19,51%	40,00%
Кукуруза	53,47%	52,58%	36,84%	53,47%	52,58%	36,84%	53,47%	52,58%	36,84%
Шрот соевый сп 47%	21,44%	17,52%	11,37%	21,44%	17,52%	11,37%	21,44%	17,52%	11,37%
Кукурузный глютен	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%
L-Изолейцин 90,5%	0,27%	0,30%	0,33%	0,27%	0,30%	0,33%	0,27%	0,30%	0,33%
L-Валин 96,5%	0,23%	0,26%	0,25%	0,23%	0,26%	0,25%	0,23%	0,26%	0,25%
Масло Подсолнечное		0,50%	2,43%		0,50%	2,43%		0,50%	2,43%
Монохлоргидрат Лизина 98	0,37%	0,41%	0,50%	0,37%	0,41%	0,50%	0,37%	0,41%	0,50%
DL-Метионин 98,5%	0,14%	0,11%	0,11%	0,14%	0,11%	0,11%	0,14%	0,11%	0,11%
L-Треонин 98%	0,11%	0,11%	0,15%	0,11%	0,11%	0,15%	0,11%	0,11%	0,15%
Соль Поваренная	0,35%	0,35%	0,35%	0,35%	0,35%	0,35%	0,35%	0,35%	0,35%
Монокальцийфосфат	0,51%	0,12%	0,06%	0,51%	0,12%	0,06%	0,51%	0,12%	0,06%
Трикальцийфосфат	1,72%	1,82%	1,27%	1,72%	1,82%	1,27%	1,72%	1,82%	1,27%
Сода Пищевая	0,14%	0,11%	0,09%	0,14%	0,11%	0,09%	0,14%	0,11%	0,09%
Стеллар про (Lonct)	-	-	-	0,020%	0,020%		0,025%	0,025%	
Кемзайм Протеаза (Kemin)	-	-	-	0,020%	0,020%		0,025%	0,025%	
АКСТРА PHU 10000	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	0,020%	0,020%		0,025%	0,025%	

Таблица 3.4.2. питательность растительных (вегетарианских) комбикормов в опытных группах с разным уровнем сырого протеина, аминокислот и ферментов

Наименование	Ед. изм.	Старт I	Рост I	Финиш I	Старт II	Рост II	Финиш II
ОЭ птицы WPSA +Ф	ккал/100г	306	313	328	306	313	328
ОЭ птицы WPSA	ккал/100г	297	304	319	297	304	319
ОЭ птицы ТАБЛ	ккал/100г	300	305	315	300	305	315
СЫРОЙ ПРОТЕИН +Ф	%	21,11	19,72	17,56	21,11	19,72	17,56
Сырой протеин	%	20,61	19,22	17,18	20,61	19,22	17,18
Сырой жир	%	2,98	3,46	5,00	2,98	3,46	5,00
Сырая клетчатка	%	3,27	3,11	2,91	3,27	3,10	2,91
Ftu	ед/кг						
Лизин +Ф	%	1,15	1,09	1,00	1,15	1,09	1,00
Лизин	%	1,15	1,08	1,00	1,15	1,08	1,00
Метионин +Ф	%	0,48	0,44	0,40	0,48	0,44	0,40
Метионин	%	0,48	0,43	0,40	0,48	0,43	0,40
Метионин+Цистин +Ф	%	0,83	0,76	0,70	0,83	0,76	0,70
Метионин+Цистин	%	0,82	0,76	0,70	0,82	0,76	0,70
Треонин +Ф	%	0,83	0,77	0,70	0,83	0,77	0,70
Треонин	%	0,83	0,76	0,70	0,83	0,76	0,70
Триптофан	%	0,21	0,19	0,17	0,21	0,19	0,17
Аргинин +Ф	%	1,13	1,01	0,84	1,13	1,01	0,84
Аргинин	%	1,12	1,01	0,84	1,12	1,01	0,84
Изолейцин +Ф	%	1,06	1,01	0,93	1,06	1,01	0,93
Изолейцин	%	1,05	1,01	0,93	1,05	1,01	0,93

Окончание таблицы 3.4.2.

Лейцин	%	2,02	1,90	1,65	2,02	1,90	1,65
Валин	%	1,14	1,10	0,98	1,14	1,10	0,98
Лизин Sid Птица +Ф	%	1,07	1,01	0,94	1,07	1,01	0,94
Лизин Sid Птица	%	1,05	0,99	0,92	1,05	0,99	0,92
Метионин Sid Пт +Ф	%	0,46	0,41	0,38	0,46	0,41	0,38
Метионин Sid Пт	%	0,45	0,41	0,38	0,45	0,41	0,38
М+Ц Sid Птица +Ф	%	0,75	0,69	0,64	0,75	0,69	0,64
М+Ц Sid Птица	%	0,74	0,68	0,64	0,74	0,68	0,64
Треонин Sid Пт. +Ф	%	0,74	0,69	0,64	0,74	0,69	0,64
Треонин Sid Пт.	%	0,72	0,67	0,62	0,72	0,67	0,62
Триптофан Sid Пт +Ф	%	0,18	0,17	0,15	0,18	0,17	0,15
Триптофан Sid Пт	%	0,18	0,16	0,14	0,18	0,16	0,14
Аргинин Sid Пт. +Ф	%	1,05	0,94	0,78	1,05	0,94	0,78
Аргинин Sid Пт.	%	1,02	0,91	0,75	1,02	0,91	0,75
Изолейцин Sid Пт +Ф	%	0,99	0,96	0,89	0,99	0,96	0,89
Изолейцин Sid Пт	%	0,97	0,94	0,87	0,97	0,94	0,87
Лейцин Sid Пт. +Ф	%	1,87	1,77	1,55	1,87	1,77	1,55
Лейцин Sid Пт.	%	1,84	1,73	1,51	1,84	1,73	1,51
Валин Sid Птица +Ф	%	1,07	1,03	0,93	1,07	1,03	0,93
Валин Sid Птица	%	1,04	1,01	0,90	1,04	1,01	0,90
C18:2 Ω6	%	1,36	1,69	2,78	1,36	1,69	2,78
Са +Ф	%	1,01	0,96	0,76	1,01	0,96	0,76
Са	%	0,82	0,77	0,56	0,82	0,77	0,56
Р	%	0,71	0,62	0,52	0,71	0,62	0,52
Р Усвояемый +Ф	%	0,50	0,42	0,36	0,50	0,42	0,36
Р Усвояемый	%	0,36	0,28	0,22	0,36	0,28	0,22
К	%	0,66	0,60	0,52	0,66	0,60	0,52
Na	%	0,20	0,19	0,18	0,20	0,19	0,18
Cl	%	0,32	0,33	0,35	0,32	0,33	0,35

Таблица 3.4.3. Уровень питательности рецептов растительных (вегетарианских) комбикормов контрольной группы с разным уровнем сырого протеина, аминокислот и ферментов

Наименование	Ед. изм.	Старт к	Рост к	Финиш к
ОЭ птицы WPSA +Ф	ккал/100г	306	313	328
ОЭ птицы WPSA	ккал/100г	297	304	319
ОЭ птицы ТАБЛ	ккал/100г	300	305	315
Сырой протеин +Ф	%	21,00	19,61	17,56
Сырой протеин	%	20,61	19,22	17,18
Сырой жир	%	2,98	3,46	5,00
Сырая клетчатка	%	3,28	3,11	2,91
Ftu	ед/кг			
Лизин	%	1,15	1,08	1,00
Метионин	%	0,48	0,43	0,40
Метионин+Цистин	%	0,82	0,76	0,70
Треонин	%	0,83	0,76	0,70
Триптофан	%	0,21	0,19	0,17
Аргинин	%	1,12	1,01	0,84
Изолейцин	%	1,05	1,01	0,93
Лейцин	%	2,02	1,90	1,65
Валин	%	1,14	1,10	0,98
Лизин Sid Птица +Ф	%	1,07	1,01	0,94
Лизин Sid Птица	%	1,05	0,99	0,92
Метионин Sid Пт	%	0,45	0,41	0,38
М+Ц Sid Птица +Ф	%	0,75	0,69	0,64
М+Ц Sid Птица	%	0,74	0,68	0,64
Треонин Sid Пт. +Ф	%	0,74	0,69	0,64
Треонин Sid Пт.	%	0,72	0,67	0,62
Триптофан Sid Пт +Ф	%	0,18	0,17	0,15
Триптофан Sid Пт	%	0,18	0,16	0,14
Аргинин Sid Пт. +Ф	%	1,04	0,94	0,78
Аргинин Sid Пт.	%	1,02	0,91	0,75
Изолейцин Sid Пт +Ф	%	0,99	0,96	0,89
Изолейцин Sid Пт	%	0,97	0,94	0,87
Лейцин Sid Пт. +Ф	%	1,87	1,77	1,55
Лейцин Sid Пт.	%	1,84	1,73	1,51
Валин Sid Птица +Ф	%	1,06	1,03	0,93
Валин Sid Птица	%	1,04	1,01	0,90
C18:2 Ω6	%	1,36	1,69	2,78
Са +Ф	%	1,01	0,96	0,76
Са	%	0,82	0,77	0,56
Р	%	0,71	0,62	0,52
Р Усвояемый +Ф	%	0,50	0,42	0,36
Р Усвояемый	%	0,36	0,28	0,22
К	%	0,66	0,60	0,52
Na	%	0,20	0,19	0,18
Cl	%	0,32	0,33	0,35

Таким образом, разработанные рационы, с относительным снижением протеина менее 10%, не противоречат, а развивают современные рекомендации, смещая фокус с общего протеина на обеспечение доступности ключевых аминокислот, что позволяет повысить эффективность использования кормового белка и снизить азотистую нагрузку на окружающую среду.

В таблице 3.4.4 сведены зоотехнические показатели, по которым видно, как снижение сырого протеина в комбикормах — при балансировке кристаллическими аминокислотами и ферментами — отразилось на продуктивности бройлеров кросса Ross к 35-му дню. Сопоставление контроля и двух опытных групп дает основу для объективной оценки выбранных кормовых стратегий.

Стартовая живая масса цыплят во всех группах была одинаковой — 40,0 г. Различия по этому показателю статистически незначимы ($P > 0,05$), поэтому дальнейшее сравнение влияния рационов корректно. К 35 суткам в опытных группах проявилась отчетливая положительная динамика. Средняя живая масса росла последовательно: 2094 г в контроле, 2205 г в I опытной группе (+5,3 %) и 2287 г во II опытной (+9,2 %). Такой ряд указывает на градиент эффекта в зависимости от состава рациона; наибольший результат получен там, где аминокислоты и протеазы применяли совместно. Более детальную характеристику роста раскрывает показатель среднесуточного прироста живой массы (ADG). Его значение возросло с 58,69 г/сут. в контроле до 61,86 г/сут. (увеличен на 5,4%) в I группе и 64,20 г/сут. (повышен на 9,4%) во II группе. Эта динамика напрямую связана с конечной живой массой. Она показывает, что птица в опытных группах развивалась интенсивнее на протяжении всего периода откорма. Самый значимый с экономической точки зрения показатель — это конверсия корма (FCR). Здесь видно устойчивое улучшение. В контроле FCR составил 1,60 кг/кг. В I группе он снизился до 1,50 кг/кг, то есть на 6,25 %. Во II группе он снизился до 1,46 кг/кг, то есть на 8,75 %. При этом среднее потребление корма в сутки оставалось стабильным, около

93 г. Значит, различия в уровне потребления на полученные результаты не влияли. Получается, что улучшение FCR объясняется только более эффективной трансформацией кормовых единиц в прирост мышечной ткани. А это, в свою очередь, связано с оптимизированным аминокислотным профилем и повышенной усвояемостью протеина

Мы также проанализировали данные с разделением по полу. Общая тенденция сохраняется. И петушки, и курочки в обеих опытных группах превзошли по массе особей контрольной группы. Причём абсолютное различие было наибольшим во II группе. Это подтверждает, что применяемые рационы эффективны для обоих полов. Сохранность поголовья во всех группах была на высоком уровне (95,6-96,3 %). Значит, негативного влияния низкопротеиновых рационов на жизнеспособность птицы нет. Небольшое преимущество II группы (96,25 %) может косвенно указывать на улучшение физиологического состояния птицы. Вероятно, это связано с оптимизацией питательности рациона.

Таблица 3.4.4. Влияние снижения уровня сырого протеина в рационах, сбалансированных кристаллическими аминокислотами и ферментами, на зоотехнические показатели бройлеров кросса Ross 308 (35 дней).

Показатель	Контроль	I Опытная группа	II Опытная группа
Начальная живая масса	40,0 ± 0,42	40,0 ± 0,55	40,0 ± 0,39
Средняя живая масса, г:	2094 ± 93,60	2205 ± 47,08	2287 ± 34,97
- петушков	2198	2296	2391
- курочек	1990	2114	2183
Среднесуточный прирост живой массы, г	58,69 ± 2,375	61,86 ± 1,954	64,20 ± 2,138
Затраты корма на 1 кг прироста (FCR), кг/кг	1,60	1,50	1,46
Среднее потребление корма, г/сутки	93,80	92,79	93,83
Сохранность поголовья, %	95,62	95,58	96,25
Индекс (ЕРЕФ)	357,8	401,3	430,4

Самую объективную интегральную оценку даёт Европейский индекс эффективности производства (ЕРЕФ). Он учитывает живую массу, сохранность и затраты корма. Его значение заметно выросло. В контроле ЕРЕФ

составил 357,8. В I группе он повысился до 401,3, то есть на 12,2 %. Во II группе он достиг 430,4, то есть вырос на 20,3 %. Такое значительное увеличение EPEF во II опытной группе напрямую связано с синергетическим эффектом от двух подходов. Первый это прецизионное балансирование рациона по аминокислотам. Оно устранило дефицит лимитирующих факторов роста. Второй это включение экзогенных протеаз. Они повысили доступность аминокислот из нативных растительных компонентов и сократили долю неусвоенного протеина. В таблице 3.4.5 показано, как низкопротеиновые рационы, сбалансированные кристаллическими аминокислотами и протеазами, влияют на мясные качества и развитие внутренних органов бройлеров. Анализ данных позволяет оценить не только общий прирост, но и качество сформированной тушки. Теперь про общую динамику выхода тушки. Во II опытной группе зафиксировали максимальный абсолютный вес и полупотрошенной (1635,21 г), и потрошенной (1532,29 г) тушки. Это логично связано с её наибольшей предубойной живой массой. При этом относительные показатели выхода туш (в % от живой массы) во всех группах были сопоставимы и соответствовали норме, варьируя в пределах 66,3–67,0% для потрошенной и 70,2–71,5% для полупотрошенной. Это свидетельствует о том, что снижение уровня сырого протеина в рационе не оказало негативного влияния на общие убойные характеристики. При формировании мясных частей наиболее важным с коммерческой точки зрения является выход грудной мышцы — наиболее ценной части тушки. Наблюдается положительная динамика её абсолютной массы: от 321,01 г в контроле до 351,70 г (выше на 9,6%) в I группе и 360,66 г (выше на 12,3%) во II группе. Относительный выход грудной мышцы также увеличился, достигнув максимума в I группе (15,95%).

Сходный сдвиг затронул и бедренные мышцы. Во II группе их абсолютная масса достигла 361,60 г, что на 10,1 % выше контроля. Полученные данные позволяют предположить, что рационы с выровненным аминокислотным профилем направляют питательные вещества преимущественно на синтез мышечной ткани.

Таблица 3.4.5. Влияние экспериментальных рационов на характеристики тушек, 35 сутки

Показатель	Контроль	I Опытная группа	II Опытная группа
Масса потрошеной тушки (убойный выход)			
Относительный показатель, *	66,5 ± 0,80	66,3 ± 0,24 а	67,0 ± 0,43 а
Абсолютная масса, г	1392,51	1461,92	1532,29
Масса полупотрошеной тушки			
Относительный показатель, *	70,6 ± 0,79	70,2 ± 0,29 а	71,5 ± 0,35 б
Абсолютная масса, г	1478,36	1547,91	1635,21
Масса грудной мышцы			
Относительный показатель, *	15,33 ± 0,36	15,95 ± 0,44 а	15,77 ± 0,27 а
Абсолютная масса, г	321,01	351,70	360,66
Масса бедренной мышцы			
Относительный показатель, *	15,68 ± 0,27	15,63 ± 0,30 а	15,81 ± 0,27 а
Абсолютная масса, г	328,34	344,64	361,60
Масса желудка			
Относительный показатель, *	1,57 ± 0,09	1,45 ± 0,09 а	1,67 ± 0,05 а
Абсолютная масса, г	32,88	31,97	38,19
Масса сердца			
Относительный показатель, *	0,455 ± 0,02	0,469 ± 0,02 а	0,462 ± 0,04 а
Абсолютная масса, г	9,53	10,34	10,57
Масса печени			
Относительный показатель, *	2,02 ± 0,06	2,03 ± 0,11 а	2,37 ± 0,11 б
Абсолютная масса, г	42,30	44,76	54,20
Масса потрохов (совокупная масса)			
Относительный показатель, *	4,04 ± 0,11	3,96 ± 0,16 а	4,50 ± 0,13 б
Абсолютная масса, г	84,60	87,32	102,92
Масса абдоминального жира			
Относительный показатель, *	1,010 ± 0,08	0,939 ± 0,08 а	1,277 б
Абсолютная масса, г	21,15	20,70	29,21

Примечание. Здесь и далее: группы, обозначенные разными буквами (а, б, в), достоверно различаются при $p < 0,05$; группы с одинаковыми буквами — не различаются; обозначение двумя буквами (аб) указывает на промежуточное положение.

При сравнении развития внутренних органов была проанализирована масса внутренних органов и выявил статистически достоверные изменения ($p < 0,05$), отмеченные индексом «б», во II опытной группе. Наиболее значительно увеличилась абсолютная и относительная масса печени: на 28,1% (с 42,30 г до

54,20 г) и до 2,37% соответственно. Существенный рост также отмечен для совокупной массы потрохов (на 21,7%). Данный факт может указывать на повышенную метаболическую активность печени, связанную с необходимостью переработки возросшего количества усвоенных аминокислот и возможной адаптацией к рациону с протеазами. Масса сердца незначительно увеличилась во всех опытных группах, что коррелирует с большей живой массой птицы. Показатель массы абдоминального жира имеет разнонаправленную динамику. В I группе жир имел тенденцию к снижению — на 0,45 г в абсолютном выражении и в относительном. Во II группе, напротив, абсолютная масса жира достоверно выросла на 38,1 %, до 29,21 г. Вероятная причина — более высокая общая калорийность рациона, обусловленная лучшей усвояемостью питательных веществ, включая энергетические компоненты, под действием протеаз. Результаты биохимического анализа крови бройлеров в возрасте 35 суток приведены в таблице 3.4.6. По подавляющему большинству параметров статистически достоверных различий между контрольной и опытными группами не выявили. Это показывает, что снижение уровня сырого протеина в рационах, сбалансированных кристаллическими аминокислотами и ферментами, не ухудшает общее физиологическое состояние птицы. Формальной статистической значимости нет. Но анализ численных данных всё равно позволяет выделить ряд устойчивых тенденций. Эти тенденции согласуются с ранее наблюдавшимися изменениями в продуктивности и развитии внутренних органов. Их можно интерпретировать как адаптацию метаболизма к экспериментальным кормовым стратегиям.

Прежде всего обращает на себя внимание стабильность фундаментальных показателей белкового и азотистого обмена. Уровень общего белка в сыворотке крови оставался практически неизменным во всех группах. Это показывает, что синтетическая функция организма не была нарушена. Она сохранилась даже на фоне сниженного поступления протеина с кормом. Концентрация мочевой кислоты — это ключевой конечный продукт

пуринового обмена. В I опытной группе она показала тенденцию к снижению, примерно на 6,3 %. Это может косвенно указывать на более эффективную утилизацию азота при точной балансировке рациона синтетическими аминокислотами. Во II группе этот показатель был ближе к контрольным значениям. Динамика уровня креатинина была разнонаправленной. В I группе наблюдалась тенденция к его увеличению, на 8,5 %. Во II группе, наоборот, к выраженному снижению, на 17,3 %. Последняя тенденция наиболее заметная. Она потенциально может отражать изменения в скорости метаболических процессов или клубочковой фильтрации. Вероятно, это связано с комплексным действием аминокислот и протеаз.

Активность ферментов, по которой судят о состоянии печени (АЛТ, АСТ, ГГТ), и щелочная фосфатаза как маркер костной ткани не дали клинически значимых отклонений. Функциональное состояние этих органов, судя по полученным данным, оставалось в норме. Отдельного упоминания заслуживает аномально низкая лактатдегидрогеназа (ЛДГ) в I опытной группе. Скорее всего, мы имеем дело с артефактом или аналитической ошибкой: столь резкое падение активности ключевого фермента гликолиза не находит биологического объяснения и не согласуется с остальными показателями.

В липидном профиле наметились любопытные сдвиги, хотя статистически они не подтверждены. В I опытной группе триглицериды снизились на 12,9 %, параллельно наметился рост холестерина. Во II группе, получавшей рацион с протеазами, концентрация триглицеридов, напротив, тяготела к повышению — на 9,8 %. Это согласуется с установленным ранее достоверным увеличением массы абдоминального жира у птиц данной группы и может отражать активацию липогенеза. Вероятная причина — лучшая усвояемость рациона в целом под действием ферментного комплекса.

Наиболее заметные тенденции проявились в минеральном обмене. В обеих опытных группах уровень кальция в сыворотке крови вырос на 12–13,5 %. Возможно, это связано с оптимизацией его усвоения либо с мобилизацией из депо на фоне измененного белкового питания. Фосфор вел себя иначе: в I

группе его концентрация повысилась на 6,9 %, во II — снизилась на 4,5 %. Такие сдвиги отражают тонкую перестройку фосфорно-кальциевого гомеостаза в ответ на модификацию рациона.

Таблица 3.4.6. Биохимические показатели крови цыплят бройлеров в возрасте 35 суток ($M \pm m$, $n=3$)

Биохимический показатель	Контроль (К)	I Опытная группа	II Опытная группа
Общий белок, г/л	32,27 $\pm$ 1,34	32,36 $\pm$ 1,76 а	32,86 $\pm$ 1,35 а
Мочевая кислота, мкмоль/л	543,43 $\pm$ 13,54	509,18 $\pm$ 62,87а	534,36 $\pm$ 45,23
Креатинин, мкмоль/л	35,34 $\pm$ 1,34	38,34 $\pm$ 2,23б	29,23 $\pm$ 2,34а
АЛТ (АЛаТ), Ед/л	3,23 $\pm$ 1,34	3,45 $\pm$ 0,24а	3,57 $\pm$ 0,78а
АСТ (АСаТ), Ед/л	144,43 $\pm$ 7,28	156,45 $\pm$ 2,46а	145,34 $\pm$ 10,33а
Щелочная фосфатаза (ЩФ), Ед/л	3500,0 $\pm$ 255	3800,0 $\pm$ 335а	3200,0 $\pm$ 283а
Глутамилтрансфераза (ГГТ), Ед/л	18,52 $\pm$ 1,24	20,3 4 $\pm$ 1,54а	16,86 $\pm$ 1,46а
Общий билирубин, мкмоль/л	3,4 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,6а	3,1 $\pm$ 0,4а
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), Ед/л	754,2 $\pm$ 45,0	788,1 $\pm$ 34,2	734,3 $\pm$ 42,6
Кальций, ммоль/л	2,45 $\pm$ 0,11	2,75 $\pm$ 0,23а	2,78 $\pm$ 0,47а
Глюкоза, ммоль/л	11,03 $\pm$ 0,11	11,89 $\pm$ 0,17а	12,02 $\pm$ 0,12а
Фосфор, ммоль/л	2,45 $\pm$ 0,02	2,62 $\pm$ 0,03а	2,34 $\pm$ 0,03с
Холестерин, ммоль/л	3,4 $\pm$ 0,11	3,9 $\pm$ 0,46а	3,4 $\pm$ 0,77а
Триглицериды, ммоль/л	1,32 $\pm$ 0,09	1,15 $\pm$ 0,13а	1,45 $\pm$ 0,15а

Примечание. Разными буквами обозначены достоверные различия между группами ($p < 0,05$).

Снижение уровня сырого протеина в комбикормах на 2,0–2,5 процентных пункта статистически достоверно повышает продуктивность бройлеров. Ключевое условие — последующая балансировка рациона кристаллическими аминокислотами: лизином, метионином, треонином, валином, изолейцином. Дополнительное введение комплекса экзогенных протеаз даёт дальнейшее синергетическое улучшение ключевых показателей. Это живая масса, среднесуточный прирост, конверсия корма и интегральный индекс EРЕF. Полученные данные подтверждают, что комплексный подход целесообразен. Он сочетает принципы низкопротеинового питания, прецизионного аминокислотного баланса и ферментной технологии. Это нужно для повышения экономической и питательной эффективности бройлерного производства.

Применение низкопротеиновых рационов, сбалансированных кристаллическими аминокислотами, привело к достоверному повышению продуктивности. В I опытной группе использовали протеазу 400 г/т и аминокислоты. По сравнению с контролем живая масса увеличилась на 111 г, то есть на 5,3 %. Суточный прирост вырос на 3,17 г, то есть на 5,4 %. Конверсия корма улучшилась на 0,10 кг/кг, то есть на 6,25 %. Интегральный индекс ЕРЕФ вырос на 12,2 %. Затем дозу протеаз увеличили до 500 г/т. Это II опытная группа. Здесь получили синергетический эффект и максимальные результаты. Прирост живой массы составил 193 г, то есть 9,2 %. Суточный прирост составил 5,51 г, то есть 9,4 %. Конверсия корма улучшилась на 0,14 кг/кг, то есть на 8,75 %. Индекс ЕРЕФ достиг 430,4. Это на 20,3 % выше контроля. Использование низкопротеиновых рационов значительно увеличило абсолютную массу ценных мясных частей. Во II группе масса грудной мышцы выросла на 39,65 г, то есть на 12,3 %. Масса бедренной мышцы выросла на 33,26 г, то есть на 10,1 % по сравнению с контролем. При этом выход туш (66-67 %) остался стабильным. Ключевое изменение это достоверное увеличение массы печени во II группе. Она выросла на 11,9 г, то есть на 28,1 %. Масса абдоминального жира выросла на 8,06 г, то есть на 38,1 %. Это указывает на глубокое влияние протеаз на метаболизм. Получается, что аминокислотная балансировка эффективно поддерживает рост мышц. А добавка ферментов улучшает усвояемость и существенно изменяет физиологический статус и липидный обмен птицы.

Проведённый анализ биохимических показателей крови позволяет заключить следующее. Мы применяли низкопротеиновые растительные рационы, сбалансированные по аминокислотному профилю. Для этого использовали кристаллические лизин, метионин, треонин, валин и изолейцин. Также применяли их комбинацию с экзогенными протеазами. Всё это не вызывает нарушений в метаболическом статусе бройлеров. Достоверных негативных сдвигов по ключевым клинико-биохимическим параметрам нет. Это общий белок, печёночные ферменты, билирубин. Значит,

физиологическая безопасность данных кормовых стратегий подтверждена. Наблюдаемые тенденции носят адаптивный характер. К ним относятся потенциальное повышение эффективности использования азота (снижение мочевой кислоты), активация липогенеза при действии протеаз (рост триглицеридов) и модуляция минерального обмена. Эти тенденции логично встраиваются в общую картину улучшения продуктивности. Эти тенденции указывают на то, что организм птицы адекватно перестраивает метаболические процессы в ответ на изменение качества, а не количества, питательных веществ, однако для окончательного подтверждения их значимости требуются дальнейшие исследования с увеличенным объёмом выборки.

Установлено, что снижение уровня сырого протеина в растительных рационах для бройлеров на 2,0 и 1,5 процентных пункта на фазах старта и роста соответственно (что соответствует относительному снижению на 9,5% и 7,9%) с последующей компенсацией дефицита прецизионным введением кристаллических аминокислот (лизина, метионина, треонина, валина и изолейцина) достоверно повышает продуктивность. Синергетический эффект оказался максимальным при дополнительном введении комплекса протеаз. Именно в этой группе прирост живой массы достиг 9,2 % (2287 г), конверсия корма улучшилась на 8,8 % (1,46 кг/кг), а интегральный индекс эффективности производства (EPEF) поднялся на 20,3 % (430,4 ед.) относительно контроля.

Разработанные низкопротеиновые рационы не просто удерживают мясные качества туши — они их улучшают. Абсолютная масса грудной мышцы во II опытной группе выросла на 12,3 % (39,65 г), бедренной — на 10,1 % (33,26 г); выход потрошеной туши при этом оставался стабильным, 66–67 %. Влияние протеаз на метаболизм также оказалось достоверным: масса печени увеличилась на 28,1 % (11,9 г), абдоминального жира — на 38,1 % (8,06 г). Это указывает на интенсивную перестройку обменных процессов.

Стратегия аминокислотной балансировки физиологически безопасна. Статистически достоверных негативных отклонений в основных

биохимических показателях крови — общем белке и активности печёночных ферментов — не выявлено. При этом выявлены адаптивные тенденции. В группе с протеазами отмечен рост уровня триглицеридов на 9,8 %, до 1,45 ммоль/л, и кальция на 13,5 %, до 2,78 ммоль/л. Это коррелирует с улучшением усвояемости питательных веществ и общей метаболической активностью.

Мы также установили практическую эффективность подхода. Он основан на сокращении доли дорогостоящего соевого шрота в рецептуре на 24-27 %. Это достигается за счёт включения 6 % кукурузного глютена и сбалансированного введения аминокислот. Такая стратегия позволяет не только снизить себестоимость комбикорма, но и существенно уменьшить азотистую нагрузку на окружающую среду. Это происходит за счёт более эффективного использования протеина. Подтверждается это улучшением конверсии корма до 1,46 кг/кг.

3.5. Практический потенциал применения разных концентраций комплекса протеаз, кристаллических форм аминокислот в низкопротеиновых рационах бройлеров с включением перьевой муки

В таблице 3.5.1 приведены детализированные рецептуры низкопротеиновых комбикормов. Их разработали для контроля и трёх опытных групп. Все рационы включают 6 % перьевой муки как альтернативный источник белка животного происхождения. В опытных группах достигнуто снижение уровня сырого протеина на 2,0 процентных пункта на фазе старта, с 21,0 % до 19,0 %. На фазе роста снижение составило 1,5 процентных пункта, с 19,0 % до 17,5 %, по сравнению с контролем. Дефицит аминокислот закрывали повышенным вводом кристаллического лизина (до 0,32 %), метионина (до 0,65 %), треонина (до 0,32 %), а также валина и изолейцина. Группы различались лишь дозой комбинированного ферментного препарата: II получала протеазы 500 г/т (0,05 %), III — 1000 г/т (0,10 %). Питательная ценность рационов по доступным аминокислотам, энергии и минеральным веществам оставалась на оптимальном уровне — это и позволяло корректно сопоставить эффект дозы фермента.

Разработанные рецептуры низкопротеиновых комбикормов с перьевой мукой, сбалансированные кристаллическими аминокислотами и содержащие градиент доз экзогенных протеаз (0, 500 и 1000 г/т), оказались научно обоснованной моделью для изучения дозозависимого действия ферментов на трудноусвояемых белковых ингредиентах. Состав таких рационов отвечает принципам прецизионного кормления: акцент смещен с общего уровня протеина на точный аминокислотный баланс, а ферменты повышают доступность питательных веществ.

Таблица 3.5.1. Рецепты комбикормов в контрольных и опытных группах с разным уровнем сырого протеина, аминокислот и ферментов, % или представленных единицах

Наименование	Контроль			Опыт I			Опыт II			Опыт III		
	Старт к	Рост к	Финиш к	Старт I	Рост I	Финиш I	Старт II	Рост II	Финиш II	Старт III	Рост III	Финиш III
Пшеница	23,23%	27,01%	31,61%	34,25%	33,08%	32,030%	34,14%	32,98%	32,03%	34,04%	32,88%	32,03%
Кукуруза	44,99%	46,00%	46,00%	40,00%	45,00%	47,00%	40,00%	45,00%	47,00%	40,00%	45,00%	47,00%
Шрот соевый , СП 44%	20,60%	14,60%	9,23%	14,02%	9,14%	7,88%	14,05%	9,16%	7,88%	14,08%	9,19%	7,88%
Мука пер. А. гидр, СП 84%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%	6,00%
L-Изолейцин, 90,5%	0,22%	0,29%	0,30%	0,35%	0,40%	0,34%	0,35%	0,40%	0,34%	0,35%	0,40%	0,34%
L-Валин, 96,5%	0,07%	0,14%	0,11%	0,21%	0,26%	0,16%	0,21%	0,26%	0,16%	0,21%	0,26%	0,16%
Масло подсолнечное	1,43%	2,57%	3,67%	1,21%	2,22%	3,53%	1,24%	2,25%	3,53%	1,27%	2,27%	3,53%
Монохлоргидрат Лизина, 98%	0,19%	0,29%	0,28%	0,33%	0,40%	0,32%	0,33%	0,40%	0,32%	0,33%	0,40%	0,32%
Сульфат Лизина	0,25%	0,24%	0,36%	0,36%	0,34%	0,36%	0,36%	0,34%	0,36%	0,35%	0,34%	0,36%
DL-Метионин, 98,5%	0,26%	0,23%	0,23%	0,20%	0,18%	0,07%	0,20%	0,18%	0,07%	0,20%	0,18%	0,07%
L-Треонин, 98%	0,04%	0,06%	0,08%	0,15%	0,16%	0,11%	0,15%	0,16%	0,11%	0,15%	0,16%	0,11%
L-Триптофан, 98%	0,02%	0,02%	0,03%	0,05%	0,06%	0,04%	0,05%	0,06%	0,04%	0,05%	0,06%	0,04%
Калия карбонат (Поташ)		0,05%	0,20%	0,04%	0,20%	0,24%	0,04%	0,20%	0,24%	0,04%	0,20%	0,24%
Соль поваренная	0,31%	0,32%	0,32%	0,32%	0,32%	0,32%	0,32%	0,32%	0,32%	0,32%	0,32%	0,32%
Монокальцийфосфат	0,33%	0,07%	0,01%	0,48%	0,10%	0,02%	0,48%	0,10%	0,02%	0,48%	0,10%	0,02%
Трикальцийфосфат	1,76%	1,81%	1,27%	1,73%	1,84%	1,28%	1,73%	1,84%	1,28%	1,73%	1,84%	1,28%
Сода пищевая	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Акстра Phy 10000	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т	100,00г/т
Стеллар Про (Lonct)	-	-	-	-	-	-	0,025%	0,025%	-	0,050%	0,050%	-
Кемзайм Протеаза (kemin)	-	-	-	-	-	-	0,025%	0,025%	-	0,050%	0,050%	-
Премикс бро. 0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%

Таблица 3.5.2 Уровень питательности комбикормов в опытных группах с разным уровнем сырого протеина, аминокислот и ферментов

Наименование	Ед. изм.	Старт I	Рост I	Финиш I	Старт II	Рост II	Финиш II	Старт III	Рост III	Финиш III
ОЭ бройлеров +Ф	ккал/100г	290	302	313	290	302	313	290	302	313
ОЭ бройлеров	ккал/100г	281	293	304	281	293	304	281	293	304
ОЭ птицы ТАБЛ	ккал/100г	295	305	315	295	305	315	295	305	315
Сырой протеин +Ф	%	19,38	17,67	16,89	19,39	17,66	16,89	19,38	17,67	16,89
Сырой протеин	%	19,00	17,28	16,51	19,00	17,28	16,51	19,00	17,28	16,51
Сырой жир	%	3,81	4,93	6,29	3,84	4,96	6,29	3,87	4,98	6,29
Сырая клетчатка	%	2,75	2,46	2,38	2,75	2,46	2,38	2,75	2,46	2,38
Ftu	ед/кг	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Лизин	%	1,16	1,08	1,00	1,16	1,08	1,00	1,15	1,08	1,00
Метионин	%	0,44	0,40	0,29	0,44	0,40	0,29	0,44	0,40	0,29
Цистин	%	0,45	0,42	0,41	0,44	0,42	0,41	0,44	0,42	0,41
Метионин+Цистин	%	0,89	0,82	0,70	0,89	0,82	0,70	0,89	0,82	0,70
Треонин	%	0,83	0,76	0,70	0,83	0,76	0,70	0,83	0,76	0,70
Триптофан	%	0,24	0,22	0,20	0,24	0,22	0,20	0,24	0,22	0,20
Аргинин	%	1,09	0,95	0,91	1,09	0,95	0,91	1,10	0,95	0,91
Изолейцин	%	1,05	1,01	0,93	1,05	1,01	0,93	1,05	1,01	0,93
Лейцин	%	1,51	1,39	1,36	1,51	1,39	1,36	1,51	1,39	1,36
Валин	%	1,14	1,10	0,98	1,14	1,10	0,98	1,14	1,10	0,98
Лизин Sid Птица +Ф	%	1,05	0,99	0,91	1,05	0,99	0,91	1,05	0,99	0,91
Лизин Sid Птица	%	1,03	0,97	0,89	1,03	0,97	0,89	1,03	0,97	0,89
Метионин Sid Пт +Ф	%	0,41	0,38	0,26	0,41	0,38	0,26	0,41	0,38	0,26
Метионин Sid Пт	%	0,41	0,37	0,26	0,41	0,37	0,26	0,41	0,37	0,26
М+Ц Sid Птица +Ф	%	0,73	0,67	0,55	0,73	0,67	0,55	0,73	0,67	0,55
М+Ц Sid Птица	%	0,72	0,66	0,54	0,72	0,66	0,54	0,72	0,66	0,54
Треонин Sid Пт. +Ф	%	0,69	0,64	0,57	0,69	0,64	0,57	0,69	0,64	0,57
Треонин Sid Пт.	%	0,66	0,61	0,55	0,66	0,61	0,55	0,66	0,61	0,55
Триптофан Sid Пт +Ф	%	0,21	0,19	0,17	0,21	0,19	0,17	0,21	0,19	0,17
Триптофан Sid Пт	%	0,20	0,19	0,16	0,20	0,19	0,16	0,20	0,19	0,16
Аргинин Sid Пт. +Ф		0,94	0,81	0,78	0,95	0,81	0,78	0,95	0,81	0,78

Продолжение таблицы 3.5.2.

Аргинин Sid Пт.	%	0,92	0,79	0,76	0,92	0,79	0,76	0,92	0,79	0,76
Изолейцин Sid Пт +Ф	%	0,97	0,94	0,86	0,97	0,94	0,86	0,97	0,94	0,86
Изолейцин Sid Пт	%	0,95	0,92	0,84	0,95	0,92	0,84	0,95	0,92	0,84
Лейцин Sid Пт. +Ф	%	1,31	1,21	1,18	1,31	1,21	1,18	1,31	1,21	1,18
Лейцин Sid Пт.	%	1,28	1,18	1,15	1,28	1,18	1,15	1,28	1,18	1,15
Валин Sid Птица +Ф	%	1,01	0,98	0,86	1,01	0,98	0,86	1,01	0,98	0,86
Валин Sid Птица	%	0,98	0,95	0,84	0,98	0,95	0,84	0,98	0,95	0,84
C18:2 Ω6	%	1,90	2,59	3,43	1,92	2,61	3,43	1,94	2,62	3,43
Са +Ф	%	1,01	0,96	0,76	1,01	0,96	0,76	1,01	0,96	0,76
Са	%	0,81	0,76	0,57	0,81	0,76	0,57	0,81	0,76	0,57
Р	%	0,69	0,60	0,49	0,69	0,60	0,49	0,69	0,59	0,49
Р Усвояемый +Ф	%	0,50	0,42	0,36	0,50	0,42	0,36	0,50	0,42	0,36
Р Усвояемый	%	0,36	0,28	0,23	0,36	0,28	0,23	0,36	0,28	0,23
К	%	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Na	%	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Cl	%	0,31	0,32	0,31	0,31	0,32	0,31	0,31	0,32	0,31

Таблица 3.5.3. Уровень питательности комбикормов в контрольной группе с разным уровнем сырого протеина, аминокислот и ферментов

Наименование	Ед. изм.	Старт к	Рост к	Финиш к
ОЭ птицы WPSA +Ф	ккал/100г	303	316	329
ОЭ птицы WPSA	ккал/100г	294	307	320
ОЭ птицы ТАБЛ	ккал/100г	295	305	315
Сырой протеин +Ф	%	21,38	19,38	17,56
Сырой протеин	%	21,00	19,00	17,18
Сырой жир	%	4,24	5,40	6,51
Сырая клетчатка	%	3,03	2,72	2,45
Лизин	%	1,15	1,08	1,00
Метионин	%	0,53	0,48	0,45
Цистин	%	0,48	0,45	0,43
Метионин+Цистин	%	1,01	0,93	0,88
Треонин	%	0,83	0,76	0,70
Триптофан	%	0,24	0,21	0,20
Аргинин	%	1,29	1,12	0,97
Изолейцин	%	1,05	1,01	0,93
Лейцин	%	1,73	1,56	1,41
Валин	%	1,14	1,10	0,98
Лизин Sid Птица +Ф	%	1,03	0,97	0,91
Лизин Sid Птица	%	1,01	0,95	0,89
Метионин Sid Пт +Ф	%	0,50	0,45	0,43
Метионин Sid Пт	%	0,50	0,45	0,42
М+Ц Sid Птица +Ф	%	0,84	0,76	0,72
М+Ц Sid Птица	%	0,83	0,75	0,72
Треонин Sid Пт. +Ф	%	0,66	0,61	0,57
Треонин Sid Пт.	%	0,64	0,59	0,54
Триптофан Sid Пт +Ф	%	0,20	0,18	0,16
Триптофан Sid Пт	%	0,20	0,17	0,16
Аргинин Sid Пт. +Ф	%	1,12	0,96	0,83
Аргинин Sid Пт.	%	1,10	0,94	0,80
Изолейцин Sid Пт +Ф	%	0,95	0,93	0,86
Изолейцин Sid Пт	%	0,93	0,90	0,84
Лейцин Sid Пт. +Ф	%	1,50	1,36	1,23
Лейцин Sid Пт.	%	1,47	1,32	1,20
Валин Sid Птица +Ф	%	0,98	0,96	0,85
Валин Sid Птица	%	0,95	0,93	0,82
C18:2 Ω6	%	2,06	2,80	3,51
Ca +Ф	%	1,01	0,96	0,76
Ca	%	0,82	0,77	0,57
P	%	0,68	0,60	0,49
P Усвояемый +Ф	%	0,48	0,42	0,36
P Усвояемый	%	0,35	0,28	0,23
K	%	0,67	0,60	0,60
Na	%	0,18	0,18	0,18
Cl	%	0,28	0,30	0,30

В таблице 3.5.4 сведены показатели продуктивности бройлеров за 44 суток выращивания. Птица из групп с протеазами (II и III) к концу периода весила в среднем 3164 г — достоверно больше контроля (3066 г) на 98–99 г, или на 3,2 %. Иначе выглядит группа I, где применяли только аминокислоты, без ферментов: 3016 г, на 50 г ниже контроля. Разрыв подчеркивает роль протеаз в реализации потенциала низкопротеинового рациона. Максимальный среднесуточный прирост зафиксирован в группе III — 68,43 г/сут. Конверсия корма (FCR) улучшилась в группах II и III до 1,59 кг/кг. В контроле она составила 1,64 кг/кг, а в группе I 1,67 кг/кг. Значит, эффективность использования кормовой энергии выросла на 3,0–3,1 %. Наиболее значим рост интегрального индекса эффективности производства (EPEF). В контроле EPEF составил 385,6. В группе II он вырос до 427,3, то есть на 10,8 %. В группе III он достиг 432,3, то есть вырос на 12,1 %. Здесь виден явный дозозависимый положительный эффект. Сохранность поголовья во всех группах была высокой. В группе III отмечена тенденция к улучшению (97,0 %).

Таблица 3.5.4. Показатели продуктивности при использовании комбикормов с разным уровнем сырого протеина аминокислот и ферментов, 44 сутки.

Показатель	Контроль	I Опытная группа	II Опытная группа	III Опытная группа
Начальная живая масса, г	45,1 ± 0,24	46,0 ± 0,65	45,2 ± 0,67	44,8 ± 0,34
Средняя живая масса, г	3066,1 ± 56,34	3016,0 ± 7,08	3164,2 ± 45,45	3164,8 ± 45,45
Прирост живой массы, г	3021 ± 56,34	2970 ± 87,08 ^b	3119 ± 45,45 ^a	3120 ± 45,45 ^a
- петушков	3230	3177	3335	3335
- курочек	2904	2855	2995	2995
Среднесуточный прирост живой массы, г	68,34 ± 1,457	67,81 ± 2,409	68,11 ± 3,449	68,43 ± 2,354
Затраты корма на 1 кг прироста (FCR), кг/кг	1,64	1,67	1,59	1,59
Затраты корма на 1 голову, кг	4,954	4,960	4,959	4,961
Эффективность использования комбикорма, %	60,98	59,88	62,89	62,89

Окончание таблицы 3.5.4.

Сохранность поголовья, %	95,62	95,58	96,25	97,00
Индекс (ЕРЕФ)	385,6	370,3	427,3	432,3

Примечание: статистическая значимость различий по сравнению с контрольной группой обозначена: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$; аналогично а, аа, ааа — достоверность различий по сравнению с Опытной группой I; б, бб, ббб — достоверность различий по сравнению с Опытной группой II. Тут и далее

Мы показали, что комбинированные протеазы в дозе 500-1000 г/т нужно включать в низкопротеиновый рацион, сбалансированный кристаллическими аминокислотами. Это достоверно повышает конечную живую массу на 3,2 %. Также улучшается конверсия корма на 3,0-3,1 %. И значительно растёт общий индекс эффективности производства ЕРЕФ на 10,8-12,1 %. А вот если протеаз в рационе нет, продуктивность снижается. Это видно на примере группы I. Рацион там аналогичен по аминокислотному профилю. Значит, ферменты незаменимы для усвоения питательных веществ из рационов с перьевой мукой. Полученные данные демонстрируют, что для реализации потенциала сниженного протеина необходимо не только аминокислотное балансирование, но и ферментативная поддержка переваримости. В следующих таблицах представлены результаты комплексной органолептической оценки различных видов мясной продукции. По всем ключевым параметрам (внешний вид, консистенция, запах, нежность, сочность) образцы мяса от птицы III группы, получавшей 1000 г/т протеаз, получили наивысшие оценки. Так, общий балл для белого варёного мяса (грудки) составил $4,90 \pm 0,34$ против $4,64 \pm 0,28$ в контроле; для красного запечённого мяса (бедр) $4,96 \pm 0,04$ против $4,46 \pm 0,28$. Особенно значительно улучшились показатели нежности (до 5,00) и сочности (до 4,90) красного мяса.

Улучшение текстуры и сочности мяса, по-видимому, связано с более сбалансированным аминокислотным питанием и оптимизацией протеолитических процессов в мышечной ткани, что способствовало улучшению гидратации и структуры белков. Оценка бульона также выявила наилучшие результаты в группе III (общий балл $4,70 \pm 0,29$), что указывает на

более высокие экстрактивные и вкусоароматические качества продукции. Было установлено, что применение комбинированных протеаз, особенно в дозе 1000 г/т, приводит к существенному улучшению органолептических свойств мяса бройлеров, выращенных на низкопротеиновых рационах с перьевой мукой.

Таблица 3.5.5. Органолептическая оценка белого вареного мяса (грудки) бройлеров на 44 день убоя

Показатель	Контроль (К)	I Опытная группа	II Опытная группа	III Опытная группа
Внешний вид	4,7 ± 0,1	4,6 ± 0,3	4,6 ± 0,6	5,0 ± 0,2
Консистенция	4,9 ± 0,2	4,4 ± 0,4	4,5 ± 0,3	4,9 ± 0,4
Запах	4,7 ± 0,5	4,8 ± 0,3	4,3 ± 0,4	4,9 ± 0,3
Нежность	4,4 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,3	4,9 ± 0,3
Сочность	4,5 ± 0,2	4,4 ± 0,4	4,5 ± 0,2	4,8 ± 0,5
Общий балл	4,64 ± 0,28	4,52 ± 0,34	4,46 ± 0,36	4,90 ± 0,34

Таблица 3.5.6. Органолептическая оценка красного вареного мяса (бедро) бройлеров на 44 день убоя

Показатель	Контроль (К)	I Опытная группа	II Опытная группа	III Опытная группа
Внешний вид	4,51 ± 0,3	4,38 ± 0,2	4,72 ± 0,3	4,90 ± 0,1
Консистенция	4,80 ± 0,1	4,18 ± 0,7	4,60 ± 0,2	5,00 ± 0,0
Запах	4,56 ± 0,1	4,54 ± 0,3	4,43 ± 0,5	5,00 ± 0,0
Нежность	4,21 ± 0,3	4,18 ± 0,2	4,50 ± 0,6	5,00 ± 0,0
Сочность	4,33 ± 0,4	4,19 ± 0,2	4,60 ± 0,3	4,90 ± 0,1
Общий балл	4,46 ± 0,28	4,30 ± 0,34	4,56 ± 0,36	4,96 ± 0,04

Таблица 3.5.7. Органолептическая оценка бульона из вареной тушки бройлеров на 44 день убоя

Показатель	Контроль (К)	I Опытная группа	II Опытная группа	III Опытная группа
Внешний вид	4,65 ± 0,4	4,45 ± 0,1	4,32 ± 0,5	4,89 ± 0,2
Консистенция	4,45 ± 0,3	4,34 ± 0,4	4,34 ± 0,3	4,34 ± 0,5
Запах	4,34 ± 0,3	4,45 ± 0,2	4,45 ± 0,5	4,87 ± 0,3
Нежность	4,28 ± 0,2	4,76 ± 0,9	4,48 ± 0,1	4,47 ± 0,4
Сочность	4,76 ± 0,9	4,43 ± 0,1	4,62 ± 0,8	4,91 ± 0,04
Общий балл	4,50 ± 0,42	4,49 ± 0,34	4,44 ± 0,44	4,70 ± 0,29

Таблица 3.5.8. Органолептическая оценка красного запеченного мяса (бедро) бройлеров на 44 день убоя

Показатель	Контроль (К)	I Опытная группа	II Опытная группа	III Опытная группа
Внешний вид	4,51 ± 0,3	4,38 ± 0,2	4,72 ± 0,3	4,90 ± 0,1
Консистенция	4,80 ± 0,1	4,18 ± 0,7	4,60 ± 0,2	5,00 ± 0,0
Запах	4,56 ± 0,1	4,54 ± 0,3	4,43 ± 0,5	5,00 ± 0,0
Нежность	4,21 ± 0,3	4,18 ± 0,2	4,505 ± 0,6	5,00 ± 0,0
Сочность	4,33 ± 0,4	4,19 ± 0,2	4,601 ± 0,3	4,90 ± 0,1
Общий балл	4,46 ± 0,28	4,30 ± 0,34	4,56 ± 0,36	4,96 ± 0,04

Оценка проводилась по 5-бальной шкале (1- минимальное качество, 5- максимальное). Показатель «нежность» оценивался по степени легкости разжевывания и мягкости мышечных волокон. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение (n=5 дегустаторов).

Наблюдаемое увеличение нежности (на 18,8% для красного мяса), сочности и общей дегустационной оценки подтверждает положительное влияние ферментов на качество мышечной ткани и потребительские характеристики конечной продукции. Улучшение качественных показателей мяса связано, вероятно, с оптимизацией белкового обмена и накоплением оптимального количества внутримышечного жира в результате более эффективного усвоения аминокислот и энергии из корма. Проведенная оценка позволила дифференцировать вклад различных этапов пищеварения – полостного, пристеночного и внутриклеточного – в общий процесс гидролиза белков, а также определить влияние опытных факторов на ферментативный статус.

В таблице 3.5.9 приведены данные сравнительного анализа между контрольной и опытными группами. Он выявил статистически значимое влияние опытных факторов на активность протеаз в ключевых отделах тонкого кишечника. При этом активность в поджелудочной железе оставалась стабильной. Прежде всего проанализировали химус двенадцатиперстной кишки. Достоверных отличий опытных групп от контроля здесь не нашли. Однако в 3-й опытной группе зафиксировали максимальный показатель (85,36 ± 9,3 мг/мин/г). Это на 12,6 % выше контрольного (75,8 ± 14,3). Такая разница указывает на тенденцию к усилению протеолиза в начальном отделе.

В химусе тощей кишки активность протеаз росла отчетливо. Во 2-й и 3-й опытных группах она составила $77,3 \pm 4,9$ и $79,9 \pm 6,2$ мг/мин/г соответственно — достоверно выше контроля ($64,3 \pm 3,2$; $p < 0,001$). Прибавка достигла 20,2 и 24,3 %. Подвздошная кишка дала сходный результат: в 3-й группе активность равнялась $76,4 \pm 3,8$ мг/мин/г против $60,2 \pm 7,4$ в контроле, то есть превышала его на 26,9 % ($p < 0,001$); во 2-й группе превышение составило 18,3 % ($p < 0,01$). Высокая концентрация активных ферментов сохраняется, следовательно, и в дистальных отделах.

Отдельно исследовали гомогенат апикальной мембраны и энтероцитов. В 3-й опытной группе активность пристеночных пептидаз достигала $17,2 \pm 2,1$ мг/мин/г, достоверно превышая контроль ($10,1 \pm 7,4$; $p < 0,05$). Прирост — 70,3 %. Этот сдвиг отражает усиление мембранного пищеварения. В гомогенате поджелудочной железы значимых отличий от контроля не обнаружили: $256 \pm 34,3$ мг/мин/г. Значит, опытные факторы не влияют на её синтетическую функцию.

В результате сравнительного анализа уровня протеолитической активности в разных отделах мы показали изменение её градиента под влиянием экспериментальных факторов. В контрольной группе наблюдался классический нисходящий градиент. От двенадцатиперстной кишки ($75,8$ мг/мин/г) к тощей ($64,3$ мг/мин/г) и подвздошной ($60,2$ мг/мин/г). В 1-й опытной группе этот градиент сохранялся без существенных сдвигов.. Однако во 2-й и 3-й опытных группах отмечено его принципиальное изменение: в 3-й группе активность в химусе не снижалась, а возрастала от проксимального к дистальному отделу, что указывает на более пролонгированное действие протеаз. Параллельно в этих группах в 1,4-1,7 раза возрастала и активность пристеночных пептидаз, что свидетельствует о синхронном усилении обеих фаз гидролиза.

Наконец, сопоставление трёх типов протеолиза выявило их различную чувствительность к опытным факторам. Наибольшая абсолютная, но стабильная активность (256-273 мг/мин/г) была характерна для полостного

пищеварения в поджелудочной железе (рН 7,2-7,4). Активность полостного пищеварения в кишечнике (рН 6,2-6,4) оказалась наиболее чувствительной к воздействию, достоверно возрастая в опытных группах. При этом пристеночное пищеварение (рН 6,4), обладая наименьшей абсолютной активностью, продемонстрировало максимальный относительный прирост (увеличен на 70,3%), подчеркивая высокую пластичность мембранного гидролиза. Таким образом, на основании проведенного анализа можно сделать следующие выводы:

Введение опытных факторов (2-я и, особенно, 3-я группы) статистически значимо ($p < 0,001$) увеличивало активность полостных протеаз в химусе тощей и подвздошной кишки на 18-27%, не влияя на потенциал поджелудочной железы, что свидетельствует о повышении эффективности полостного пищеварения.

Самый выраженный относительный прирост (на 70,3 %, $p < 0,05$) отметили для активности пристеночных пептидаз в 3-й группе. Это указывает на целенаправленную стимуляцию ключевого для всасывания этапа мембранного пищеварения. Совокупность полученных данных позволяет заключить следующее. Применение факторов в 3-й опытной группе привело к существенной оптимизации протеолиза. Это произошло за счёт синергетического усиления и полостной, и мембранной фаз пищеварения. При этом нагрузки на секреторный аппарат поджелудочной железы не было.

Мы также выявили, что введение в рацион комбинации экзогенных протеаз в дозах 500 и 1000 г/т достоверно стимулирует эндогенную протеолитическую активность в желудочно-кишечном тракте бройлеров. При этом усиливаются механизмы полостного (на 12,6 %) и пристеночного (на 70,3 %) пищеварения. Данный физиологический эффект — это ключевой механизм. Этот механизм и обеспечивает более полное расщепление и усвоение белка в низкопротеиновых рационах, где часть компонентов относится к трудногидролизуемым. Усиление ферментативной активности в тонком кишечнике совпадает с улучшением продуктивных показателей, что указывает

на причинно-следственную связь: протеазы активируют пищеварение, а оно, в свою очередь, ведет к росту продуктивности птицы.

Таблица 3.5.9. Протеолитическая активность тканей поджелудочной железы, химуса 12-перстной кишки химуса тонкого отдела кишечника, гомогената апикальной мемbrane и эпителия ворсинок (энтероцитов) тонкого кишечника, мг трипсина / мин. г / ткани на 44 сутки продуктивного онтогенеза, $M \pm m$, $n=5$

Проба на ферментативную активность	Контрольная	1 опытная	2 опытная	3 опытная
Общих активностей протеаз (трипсин, химотрипсин и др.), при pH = 6,2-6,4				
Химуса 12-перстной кишки (<i>Duodenum</i>)	75,8±14,3	65,9±10,3	80,4±3,4 _{aa}	85,36±9,3
Химуса тощей кишки (<i>Jejunum</i>)	64,3±3,2	70,5±9,4 _{a,b}	77,3±4,9 _{***}	79,9 ± 6,2 _{***}
Химуса подвздошной кишки (<i>Ileum</i>)	60,2±7,4	66,7±2,9	71,2±1,6 _{**} , aa	76,4±3,8 _{***} , aaa, б
Протеолитическая активность пристеночного пищеварения (пептидазы, энтерокиназы) при pH = 6,4				
Гомогената апикальной мемbrane и эпителия ворсинок (энтероцитов) тонкого кишечника (<i>Jejunum + Ileum</i>)	10,1±7,4	10,3±1,1б	14,4±1,4 _{aaa}	17,2±2,1 _{aaa, б}
Протеолитическая активность полостного пищеварения, при pH = 7,2-7,4				
Гомогената ткани поджелудочной железы (<i>Pancreas</i>)	10,1±7,4	10,3±1,1б	14,4±1,4 _{aaa}	17,2±2,1 _{aaa, б}

Примечание. Разными буквами обозначены достоверные различия между группами ($p < 0,05$). Звёздочками обозначена достоверность различий по сравнению с контролем: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

Производственно-физиологические испытания показали: комплекс экзогенных протеаз в дозах 500 и 1000 г/т дает практический эффект и оправдан в низкопротеиновых рационах бройлеров. Такие рационы балансировали кристаллическими аминокислотами и включали перьевую муку. Установлен выраженный дозозависимый положительный эффект ферментов на все ключевые аспекты производства: продуктивность (прирост живой массы до 3164 г, улучшение затрат корма до 1,59 кг/кг.), интегральную эффективность (рост индекса EPEF на 12,1%) и качество конечной продукции (значительное улучшение органолептических свойств мяса).

Физиологической основой достигнутых результатов является доказанная способность протеаз стимулировать эндогенную ферментативную активность в кишечнике, что обеспечивает повышение переваримости и усвояемости питательных веществ, особенно из труднорасщепляемых белковых источников. Полученные данные обосновывают рекомендацию к применению комбинированных протеазных препаратов, особенно в дозе 1000 г/т, как эффективного технологического приёма для повышения экономической и ресурсной эффективности бройлерного птицеводства при использовании альтернативных белковых кормовых ресурсов.

3.6 Экологическая эффективность применения протеаз, кристаллических аминокислот в стратегиях снижения сырого протеина в рационах и экскреции азота с пометом в бройлерном производстве

В таблице 3.6.1. представлены детализированные данные по коэффициентам переваримости основных питательных веществ в низкопротеиновых рационах, сбалансированных кристаллическими аминокислотами и экзогенными протеазами. Наибольший показатель переваримости сырого протеина был достигнут во II опытной группе, получавшей комбинацию аминокислот и протеаз в дозе 500 г/т, и составил $82,34 \pm 1,71\%$. Это значение достоверно на 2,23 процентных пункта превышает контрольный показатель ($80,11 \pm 1,34 \%$). Также оно на 3,00 п.п. выше результата I опытной группы ($79,34 \pm 1,56 \%$). В этой группе применяли только аминокислоты, без ферментной добавки. Полученные данные свидетельствуют о синергетическом эффекте комбинированного использования аминокислот и протеаз. Этот эффект выражается в значимом улучшении гидролиза и последующей абсорбции белковых компонентов корма. При этом переваримость сырой клетчатки и сырого жира оставалась стабильной. Статистически между группами она не различалась. Значения варьировали в пределах 19,23-19,43 % и 78,23-78,34 % соответственно. Это указывает на избирательное действие применяемого ферментного комплекса.

Он влияет именно на белковую фракцию рациона, без существенного влияния на усвоение других питательных веществ.

Мы определили, что включение комплекса экзогенных протеаз в низкопротеиновый рацион, сбалансированный кристаллическими аминокислотами, обеспечивает достоверное повышение коэффициента переваримости сырого протеина на 2,23 процентных пункта. Так достигается максимальное значение 82,34 %. Этот результат подтверждает, что ферментная добавка эффективно компенсирует возможное снижение доступности аминокислот из растительного сырья и перьевой муки. Она усиливает протеолиз в пищеварительном тракте.

Таблица 3.6.1. Переваримость питательных веществ при использовании комбикормов с разным уровнем сырого протеина аминокислот и ферментов, $M \pm m$, $n=5$

Показатель	Контроль (К)	I Опытная группа	II Опытная группа	III Опытная группа
М. д.* сырого протеина, %	80,11 $\pm$ 1,34	79,34 $\pm$ 1,56	82,34 $\pm$ 1,71	81,13 $\pm$ 0,76
М. д. сырой клетчатки, %	19,23 $\pm$ 1,76	19,43 $\pm$ 1,17	19,34 $\pm$ 1,15	19,34 $\pm$ 1,33
М. д. сырого жира, %	78,23 $\pm$ 1,56	78,34 $\pm$ 1,56	78,23 $\pm$ 1,45	78,34 $\pm$ 1,23

* М. д. — массовая доля

Переваримость клетчатки и жира во всех группах оставалась на одном уровне. Это говорит об избирательном действии протеаз и отсутствии их негативного влияния на общую усвояемость рациона. В таблице 3.6.2 приведены данные азотного баланса — одного из главных индикаторов эффективности использования протеина организмом птицы. В опытных группах удержание азота заметно выросло. Максимум зафиксирован в III группе, получавшей удвоенную дозу протеаз (1000 г/т): 66,77 $\pm$ 1,15 %. Это на 6,43 процентных пункта выше контроля (60,34 $\pm$ 0,15 %) и соответствует верхней границе физиологически оптимального диапазона (58–67 %). Эффективность использования азота увеличивалась последовательно — с

67,34 ± 0,09 % в контроле до 69,40 ± 1,60 % в III опытной группе. Увеличение этих взаимосвязанных показателей прямо коррелирует с данными по переваримости протеина. Объясняется это более полным гидролизом белков корма. Также сказывается оптимальный аминокислотный профиль рациона. Как следствие, азот лучше включается в синтетические процессы (рост мышечной ткани). При этом его потери с экскрементами сокращаются.

Мы показали, что стратегия снижения уровня сырого протеина в рационе обеспечивает достоверное и физиологически значимое улучшение азотного баланса. Это происходит при одновременном прецизионном балансировании кристаллическими аминокислотами и введении экзогенных протеаз. Ретенция азота увеличивается на 6,43 процентных пункта, то есть на 10 %. Эффективность его использования достигает 69,40 %. Это выше контрольной группы на 3 %. Эти данные доказывают, что оптимизация протеинового питания за счёт ферментной поддержки способствует более полной утилизации азота для анаболических нужд организма. А это фундаментальная предпосылка для снижения экскреции азотистых соединений.

Таблица 3.6.2. Общий азотный баланс при целевом значении 60±5% при СП~20% при использовании комбикормов с разным уровнем сырого протеина аминокислот и ферментов, $M \pm m$, $n=5$

Показатель	Контроль (К)	I Опытная	II Опытная	III Опытная
Ретенция N ₂ , (%)	60,34±0,15	61,35±0,34*	64,03±1,01 **, а	66,77±1,15 ***, аа
Эфф. исп. N ₂ , (%)	67,34±0,09	67,23±1,31	68,2±0,98	69,4±1,60

Примечание. Разными буквами обозначены достоверные различия между группами ($p < 0,05$).

В таблице 3.6.3 сведены физико-химические параметры помёта — они дают объективную картину экологической нагрузки, связанной с выделением азотистых метаболитов. Наиболее значимый результат — снижение общего азота (Total Nitrogen, TN) в сухом веществе помёта у птиц, получавших протеазы: 23,5 ± 0,6 г/кг во II группе и 23,1 ± 0,5 г/кг в III против 25,9 ± 0,4 г/кг в контроле. Экскреция общего азота уменьшилась соответственно на 9,3 % и 10,8 %. Концентрация аммонийного азота (NH₄⁺-N), основной формы,

участвующей в образовании летучего аммиака, оказалась минимальной в III группе — $4,32 \pm 0,14$ г/кг. Влажность (73–78 %), содержание сухого вещества (22–26 %) и pH (7,4–7,8) помёта оставались в пределах типичных для бройлеров значений; достоверных межгрупповых различий по этим параметрам не выявили, что исключает их влияние на концентрацию азотистых соединений. Полученные данные показывают: улучшение переваримости протеина и оптимизация азотного баланса, достигнутые на исследуемых рационах, напрямую снижают нагрузку на окружающую среду.

Таблица 3.6.3. Оценка помета на 44 сутки продуктивного онтогенеза, $M \pm m$, $n=5$

Показатель	Контроль (К)	I оп. гр.	II оп. гр.	III оп. гр.
М. д. влаги, % в среднем	76	78	74	73
М. д. сухих веществ (СВ), % в среднем	24	22	26	27
pH	$7,7 \pm 0,04$	$7,6 \pm 0,03$	$7,4 \pm 0,02$ ***, aaa	$7,8 \pm 0,07$ a, bbb
Содержание общего азота (TN) (г кг ⁻¹) на СВ	$25,9 \pm 0,4$	$24,9 \pm 0,3$	$23,5 \pm 0,6$ *	$23,1 \pm 0,5$ **, a
Содержание аммонийного азота NH ₄ ⁺ -N (г кг ⁻¹) на СВ	$4,49 \pm 0,12$	$4,99 \pm 0,14$ *	$4,59 \pm 0,116$	$4,32 \pm 0,14$ aa
Содержание элементарного азота в форме нитратов NO ₃ ⁻ -N (мг кг ⁻¹) \ (ppm) на СВ	$128,3 \pm 2,2$	$129,3 \pm 5,2$	$130,3 \pm 2,4$	$120,1 \pm 3,2$

Примечание. Разными буквами обозначены достоверные различия между группами ($p < 0,05$).

Мы выявили, что сбалансированные низкопротеиновые рационы с протеазами статистически значимо снижают содержание общего азота в помёте — на 10,8 % (до 23,1 г/кг СВ) — и аммонийного азота — на 3,8 % (до 4,32 г/кг СВ) — по сравнению с контролем. Такое снижение экскреции азота напрямую связано с улучшенным его удержанием в организме и подтверждает экологическую эффективность предложенной кормовой стратегии. Стратегия нацелена на уменьшение эмиссии аммиака и потенциального загрязнения почв и водоёмов нитратами.

Многоуровневая оценка экологической эффективности показала: контролируемое снижение сырого протеина в рационах бройлеров — высокоэффективный технологический приём для минимизации экологического следа птицеводства. Такой эффект достигается за счёт прецизионного балансирования кристаллическими аминокислотами и применения экзогенных протеаз. Комплексный анализ выявил причинно-следственную цепь положительных изменений. Применение протеаз повышает переваримость сырого протеина на 2,23 п.п., что увеличивает ретенцию азота в организме птицы до 66,77 % и, как конечный результат, снижает экскрецию общего азота с помётом на 10,8 %. Полученные результаты демонстрируют, что современные подходы к оптимизации кормления, основанные на глубоком понимании пищеварения и метаболизма, позволяют не только повышать продуктивность, но и решать актуальные экологические задачи. Снижение азотной нагрузки способствует уменьшению эмиссии аммиака, улучшению санитарного состояния птичников и окружающей территории, а также позволяет снизить затраты на утилизацию и переработку помёта.

Таким образом, внедрение данной технологии способствует повышению как экономической, так и экологической устойчивости промышленного бройлерного производства.

3.7. Производственная проверка и экономическая эффективность

Таблица 3.7.1 и 3.7.2 представляют рецепты комбикормов с разными низкими уровнями сырого протеина в контрольной и опытной группах соответственно, схема опыта соответствует предыдущим опытам

Таблица 3.7.1. Рецепты комбикормов в контрольной и опытной группах с разными уровнями сырого протеина, аминокислот и протеаз

Наименование	Контрольная группа			Опытная группа		
	Старт	Рост	Финиш	Рост	Старт	Финиш
Пшеница	17,89%	20,81%	27,86%	34,14%	32,98%	32,03%
Кукуруза	44,99%	46,00%	45,99%	40%	45%	47%
Шрот соевый СП 44%	29,00%	25,00%	17,00%	14,05%	9,16%	7,88%
Кукурузный глютен	2,73%	2,75%	2,55%			
Мука пер. А гидр. СП 80%				6%	6%	6%
L-Изолейцин, 90,5%	0,12%	0,10%	0,18%	0,35%	0,4%	0,34%
L-Валин, 96,5%	0,15%	0,11%	0,17%	0,21%	0,26%	0,16%
L-Аргинин, 98,5%	0,24%	0,21%	0,32%			
Масло подсолнечное	0,91%	1,57%	2,53%	1,24%	2,25%	3,53%
Монохлоргидрат лизина 98%	0,27%	0,20%	0,20%	0,33%	0,4%	0,32%
Сульфат лизина	0,45%	0,44%	0,59%	0,36%	0,34%	0,36%
DL-Метионин, 98,5%	0,26%	0,37%	0,37%	0,2%	0,18%	0,07%
L-Треонин, 98%	0,23%	0,19%	0,22%	0,15%	0,16%	0,11%
L-Триптофан, 98%			0,01%	0,05%	0,06%	0,04%
Калия карбонат (Поташ)				0,04%	0,2%	0,24%
Натрия сульфат	0,07%	0,01%	0,03%			
Соль поваренная	0,30%	0,35%	0,32%	0,32%	0,32%	0,32%
АКСТРА РНУ 10000	0,39%	0,24%	0,17%	0,48%	0,1%	0,02%
Стеллар про (Lonct)	1,70%	1,35%	1,19%	1,73%	1,84%	1,28%
Кемзайм Протеаза (Kemin)	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Премикс бр. 0,25%, г/т	100,00	100,00	100,00	100	100	100

В таблице 3.7.3 представлены сводные итоговые данные производственной проверки, сравнивающие эффективность традиционного рациона (контроль) и низкопротеинового рациона, оптимизированного кристаллическими аминокислотами и комплексом протеаз (опытная группа), за 42-суточный цикл выращивания бройлеров в условиях производственного цеха.

Таблица 3.7.2 Питательность рецептов комбикормов в контрольной и опытной группах с разными уровнями сырого протеина, аминокислот и протеаз

Наименование	Ед. изм.	Контрольная группа			Опытная группа		
		Старт	Рост	Финиш	Старт	Рост	Финиш
ОЭ птицы WPSA +Ф	ккал/100г	301	311	325	313	325	336
ОЭ птицы WPSA	ккал/100г	292	302	316	304	316	327
ОЭ птицы ТАБЛ	ккал/100г	298	305	315	295	305	315
Сырой протеин +Ф	%	22,00	20,49	18,00	19,39	17,66	16,89
Сырой протеин	%	21,61	20,11	17,61	19,00	17,28	16,51
Сырой жир	%	3,51	4,20	5,16	3,84	4,96	6,29
Сырая клетчатка	%	3,64	3,44	3,04	2,75	2,46	2,38
Ftu	ед/кг	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Лизин	%	1,42	1,26	1,14	1,16	1,08	1,00
Метионин	%	0,58	0,67	0,63	0,44	0,40	0,29
Цистин	%	0,34	0,32	0,29	0,44	0,42	0,41
Метионин+Цистин	%	0,91	0,99	0,92	0,89	0,82	0,70
Треонин	%	0,97	0,87	0,78	0,83	0,76	0,70
Триптофан	%	0,24	0,22	0,19	0,24	0,22	0,20
Аргинин	%	1,49	1,35	1,23	1,09	0,95	0,91
Изолейцин	%	0,95	0,86	0,79	1,05	1,01	0,93
Лейцин	%	1,83	1,73	1,49	1,51	1,39	1,36
Валин	%	1,08	0,98	0,89	1,14	1,10	0,98
Лизин Sid Птица +Ф	%	1,32	1,18	1,08	1,05	0,99	0,91
Лизин Sid Птица	%	1,30	1,16	1,06	1,03	0,97	0,89
Метионин Sid Пт +Ф	%	0,55	0,65	0,61	0,41	0,38	0,26
Метионин Sid Пт	%	0,55	0,64	0,61	0,41	0,37	0,26
М+Ц Sid Птица +Ф	%	0,84	0,92	0,86	0,73	0,67	0,55
М+Ц Sid Птица	%	0,83	0,91	0,85	0,72	0,66	0,54
Треонин Sid Пт. +Ф	%	0,88	0,79	0,72	0,69	0,64	0,57
Треонин Sid Пт.	%	0,85	0,77	0,70	0,66	0,61	0,55
Триптофан Sid Пт +Ф	%	0,21	0,19	0,17	0,21	0,19	0,17
Триптофан Sid Пт	%	0,20	0,19	0,16	0,20	0,19	0,16
Аргинин Sid Пт. +Ф	%	1,40	1,27	1,17	0,95	0,81	0,78
Аргинин Sid Пт.	%	1,38	1,24	1,14	0,92	0,79	0,76
Изолейцин Sid Пт +Ф	%	0,88	0,80	0,75	0,97	0,94	0,86
Изолейцин Sid Пт	%	0,86	0,78	0,73	0,95	0,92	0,84
Лейцин Sid Пт. +Ф	%	1,69	1,60	1,39	1,31	1,21	1,18
Лейцин Sid Пт.	%	1,65	1,56	1,35	1,28	1,18	1,15
Валин Sid Птица +Ф	%	1,00	0,91	0,84	1,01	0,98	0,86
Валин Sid Птица	%	0,98	0,88	0,82	0,98	0,95	0,84
C18:2 Ω6	%	1,77	2,21	2,84	1,92	2,61	3,43
Ca +Ф	%	1,00	0,85	0,76	1,01	0,96	0,76
Ca	%	0,81	0,66	0,57	0,81	0,76	0,57
P +Ф	%	0,70	0,60	0,54	0,69	0,60	0,49
P	%	0,84	0,74	0,67	0,83	0,73	0,63
P Усвояемый +Ф	%	0,48	0,42	0,38	0,50	0,42	0,36
P Усвояемый	%	0,35	0,28	0,24	0,36	0,28	0,23
K	%	0,80	0,73	0,61	0,60	0,60	0,60
Na	%	0,18	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18
Cl	%	0,27	0,29	0,27	0,31	0,32	0,31

Конечная живая масса составила 3017 г против 2890 г в контроле. Это соответствует абсолютному приросту на 127 г. Среднесуточный прирост живой массы увеличился до 70,87 г.

Мы установили, что производственная апробация низкопротеинового рациона дала достоверное и комплексное улучшение всех ключевых производственно-экономических показателей. Этот рацион был сбалансирован кристаллическими аминокислотами и комплексом экзогенных протеаз. Внедрение этой технологии позволило увеличить конечную живую массу бройлеров на 5,2 %. Также улучшилась конверсия корма на 3,7 %. При этом FCR снизился на 0,03 кг, с 1,60 до 1,57. Исходя из стоимости 1 пункта конверсии, можно оценить экономическую эффективность рациона опытной группы. Мы также установили увеличение интегрального индекса эффективности производства (EPEF) на 6,82 %. Кроме того, отмечено повышение выхода продукции с единицы площади до 65 кг/м². Это напрямую говорит об улучшении эффективности использования производственных ресурсов. Результаты производственной проверки однозначно подтверждают не только зоотехническую, но и высокую экономическую эффективность предложенной стратегии кормления. Она основана на снижении уровня сырого протеина с одновременным прецизионным балансированием рациона кристаллическими аминокислотами и включением комплекса протеаз. Таким образом, производственный эксперимент служит убедительным основанием для рекомендации данной кормовой стратегии к широкому внедрению в промышленное бройлерное птицеводство. Её применение позволяет достичь существенного экономического эффекта за счёт увеличения объёмов производства, экономии кормовых ресурсов и повышения общей эффективности предприятия, обеспечивая конкурентоспособность производства в современных экономических условиях. Полученные в условиях промышленной апробации данные демонстрируют, что внедрение технологии на основе низкопротеинового рациона с включением до 6% перьевого муки в стартовый и ростовой периоды, сбалансированного

кристаллическими аминокислотами и обогащенного повышенной дозой комплекса разнонаправленных кормовых протеаз от двух производителей, обеспечивает значимое улучшение производственных показателей.

На основе полученных в ходе производственной проверки зоотехнических показателей (таблица 3.7.3) был выполнен расчет экономической эффективности использования низкопротеиновых рационов, обогащенных кристаллическими аминокислотами и комплексом протеаз. Основой для расчета послужили фактические данные о потреблении кормов, их рецептурной стоимости, сохранности поголовья и выходе мяса.

Калькуляция производилась на поголовье 20 000 цыплят-бройлеров в каждой группе при напольном содержании (плотность посадки 22 гол. /м²). Стоимость комбикормов рассчитали по рецептам из таблицы 3.7.1. Также учли актуальную рыночную стоимость сырьевых компонентов на момент апробации. Экономический эффект оценивали по двум сценариям реализации продукции. Первый по производственной цене (Про.). Второй по потребительской цене (Потреб.).

В таблице 3.7.3 приведены данные анализа. Они говорят о высокой экономической целесообразности использования опытного рациона. Валовой расход комбикорма в опытной группе был несколько больше (91 490 кг против 88 888 кг в контроле). Это связано с более высокой конечной живой массой птицы. Но средняя стоимость 1 кг корма в опыте оказалась на 1,06 руб. ниже, то есть на 4,1 %. Такой результат получен за счёт оптимизации рецептуры. Также сыграла роль замена части дорогостоящего соевого шрота более доступными компонентами и кристаллическими аминокислотами.

Это позволило сократить абсолютные затраты на корма на 29 091 руб. При этом объёмы производства мяса выросли.

Таблица 3.7.3 Расчет экономической эффективности комбикормов с разным уровнем сырого протеина аминокислот и ферментов в кормлении цыплят-бройлеров (42 дня выращивания)

Показатель	Вариант	
	Базовый	Новый
Средняя живая масса, кг	2,890	3,017
Среднесуточный прирост, г	67,85	70,87
Затраты корма на 1 кг прироста (FCR), кг/кг	1,60	1,57
Эффективность использования комбикорма, %	62,5	63,7
Сохранность поголовья, %	97,5	97,9
Выход мяса с 1 м ² , кг при посадке, 22 гол. /м ²	62,0	65,0
Индекс эффективности производства ЕРЕФ*, пункты	419,3	447,9
Разность ЕРЕФ, пункты		+ 28,6
Поголовье на начало опыта, гол.	20 000	20 000
Поголовье на конец опыта, гол.	19 500	19 580
Масса тушки потрошенной, г	1 878,5	1 961,1
Всего получено мяса (выход валовой), кг	36 630,8	38 397,4
Израсходовано комбикормов всего, кг ¹	88 888	91 490
Средняя стоимость 1 кг корма, руб.	25,98	24,92
Общие затраты на корма, руб.	2 309 784	2 280 693
Общие затраты на выращивания бройлеров, руб.	3299691	3258133
Общие затраты на производство мяса, руб.	4619568	4561386
Ориентировочная стоимость 1 кг производственная цена (Пр.), руб.	160	160
Ориентировочная стоимость 1 кг мяса в потребительская цена (Потреб.), руб.	200	200
Доход от реализации по потребительской цене, руб.	7 326 160	7 679 480
Доход от реализации по производственной цене, руб.	5 860 928	6 143 584
Прибыль от реализации по потребительской цене, руб. (Потреб.)	2706592	3118094
Прибыль от реализации по производственной цене, руб. (Про.)	2561237	2885451
Дополнительная прибыль в новом варианте, руб. (Потреб.)	–	+ 411502
Дополнительная прибыль в новом варианте, руб. (Про.)	–	+ 340838
Прибыль от рациона в расчете на 1000 голов, руб. (Потреб.)	250 819	269 939
Прибыль в расчете на 1000 голов, руб. (Про.)	177 557	193 145
Разность от рациона в прибыли в расчете на 1000 голов, руб. (Потреб.)	–	+ 19 120
Разность в прибыли в расчете на 1000 голов, руб. (Про.)	–	+ 15 588
Уровень рентабельности производства мяса, %	26,9	34,7
Уровень рентабельности производства и реализации мяса, %	58,6	68,4
Уровень рентабельности выращивания бройлеров, %	77,6	88,6

*Примечание: European Production Efficiency Factor), пункты

В таблице 3.7.3 приведены данные анализа. Они говорят о высокой экономической целесообразности использования нового варианта рациона. Валовой расход комбикорма в новом варианте был несколько больше, чем в

контроле (91 490 кг против 88 888 кг). Это связано с более высокой конечной живой массой птицы. Но средняя стоимость 1 кг корма в новом варианте оказалась на 1,06 руб. ниже, то есть на 4,1 %. Такой результат получен за счёт оптимизации рецептуры. Также сыграла роль замена части дорогостоящего соевого шрота более доступными компонентами и кристаллическими аминокислотами. Это позволило сократить абсолютные затраты на корма на 29 091 руб. При этом объёмы производства мяса выросли.

Производственные показатели тоже подтверждают превосходство нового варианта. Масса потрошенной тушки увеличилась на 82,6 г, с 1 878,5 до 1 961,1 г. Выход мяса с 1 м² вырос с 62,0 до 65,0 кг, то есть на 3,0 кг. Эффективность использования комбикорма повысилась с 62,5 % до 63,7 %. Общие затраты на выращивание бройлеров снизились на 41 558 руб. Общие затраты на производство мяса снизились на 58 182 руб.

Дополнительно мы рассчитали уровни рентабельности. Уровень рентабельности производства мяса в новом варианте составил 34,7 % против 26,9 % в базовом. Уровень рентабельности производства и реализации мяса достиг 68,4 % против 58,6 %. Уровень рентабельности выращивания бройлеров составил 88,6 % против 77,6 %. Все три показателя согласованно подтверждают экономическое превосходство опытной группы. Причём наибольший прирост отмечен по рентабельности выращивания. Это говорит о более эффективном использовании кормовых ресурсов.

Прибыль от рациона в расчёте на 1000 голов в опытной группе составила 269 939 руб. по потребительской цене и 193 145 руб. по производственной цене. Это на 19 120 руб. и 15 588 руб. соответственно выше контроля. Ключевой результат это получение дополнительной прибыли в новом варианте. При реализации продукции по производственным ценам она составила 340,8 тыс. рублей. При реализации по потребительским ценам 411,5 тыс. рублей. В пересчёте на 1000 голов разница в пользу нового варианта достигает от 15,6 до 19,1 тыс. рублей. Это зависит от канала сбыта. Расчёт экономической эффективности выполнен в соответствии с методическими

рекомендациями ВНИТИП (2022) с учётом фактических данных о потреблении кормов, их рецептурной стоимости, сохранности поголовья и выходе мяса.

Таким образом, производственная апробация подтвердила, что снижение уровня сырого протеина в комбикормах для бройлеров с одновременным балансированием рациона по аминокислотам и введением протеаз является не только зоотехнически оправданным приёмом, повышающим продуктивность, но и экономически эффективным инструментом. Данная стратегия позволяет снизить себестоимость кормов, увеличить выход продукции с единицы площади и получить стабильную дополнительную прибыль, что делает её перспективной для внедрения в промышленное птицеводство.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стратегия контролируемого снижения сырого протеина в рационах бройлеров на основе прецизионного балансирования аминокислотного профиля кристаллическими аминокислотами и включения экзогенных протеаз в эффективных дозах обеспечивает повышение продуктивности птицы и экологической устойчивости производства. Подход применим к рационам с белком растительного и животного происхождения.

Согласно поставленным задачам, были сделаны следующие выводы:

1. Методы определения активности кислых, нейтральных и щелочных протеаз разработаны, усовершенствованы и валидированы. Они адаптированы к коммерческим ферментным препаратам, премиксам и готовым комбикормам. Валидация подтвердила высокую аналитическую надежность: интерференция $\leq 0,75$ %, линейность в диапазоне 55–5501 ед./кг ($r=0,9988$), правильность REC=100,4 % (98,8–103,2 %). Чувствительность: предел обнаружения 16,6 ед./кг, предел количественного определения 55,2 ед./кг. Прецизионность $Sr=2,0$ %, $SRw=1,9$ %; неопределенность $U=7,6$ % при $k=2$. Разработанные протоколы обеспечивают точное, воспроизводимое и специфичное измерение протеолитической активности.

2. Двухэтапный метод оценки *in vitro* переваримости сухого вещества и сырого протеина адаптирован и валидирован для мясокостной и перьевой муки (Boisen & Fernández, 1997). Он снимает ограничения одноэтапного ГОСТ. Валидация подтвердила высокую правильность (recovery 98,5–102,5 %), прецизионность ($Sr=1,8$ %, $SRw=2,5$ %) и приемлемую расширенную неопределенность ($U=\pm 3,5$ %). На коммерческих образцах выявлена сильная положительная корреляция между переваримостью сухого вещества и протеина для перьевой муки ($r=0,958$) и слабая положительная для мясокостной ($r=0,348$). Одноэтапный метод систематически занижает переваримость на 13–37 % относительно двухэтапных подходов. Модифицированный протокол (пепсин 6 ч + панкреатин 18 ч) согласуется с

оригинальным для большинства образцов: разность $\leq 2,2$ п.п. Исключение — перьевая мука, она требует дальнейшей оптимизации.

3. Экзогенные протеазы — высокоэффективный прием для повышения продуктивности бройлеров на рационах с мясокостной мукой. Особенно результативна комбинация (КЕМЗАЙМ® + Стеллар Про) в дозах 400–500 г/т комбикорма, то есть по 200–250 г/т каждого. В группах с комбинированными протеазами живая масса выросла на 5,1–6,0 %, конверсия корма (FCR) улучшилась на 8,7–9,9 % относительно контроля.

4. Снижение уровня сырого протеина в вегетарианских рационах на 2,0–2,5 п.п. с последующей прецизионной балансировкой кристаллическими аминокислотами достоверно повышает продуктивность. Наибольший синергетический эффект достигается при дополнительном включении комплекса протеаз (500 г/т): прирост живой массы 9,2%, улучшение FCR на 8,8%, увеличение EPEF на 20,3% (до 430,4). Применение подхода позволяет сократить долю соевого шрота на 24–27% без ущерба для роста. Разработанные низкопротеиновые рационы улучшают мясные качества: абсолютная масса грудной мышцы увеличилась на 12,3%, бедренной – на 10,1%, при стабильном выходе потрошеной туши (66–67%). Выявлено увеличение массы печени (на 28,1%) и абдоминального жира (на 38,1%), что свидетельствует о метаболической перестройке. Стратегия физиологически безопасна: отсутствуют негативные отклонения в биохимических показателях крови; адаптивные тенденции (рост триглицеридов на 9,8%, кальция на 13,5%) коррелируют с улучшением усвояемости.

5. Доказан выраженный дозозависимый положительный эффект комбинированных протеаз в низкопротеиновых рационах с 6% перьевой муки. Включение количества протеаз в дозах 500 и 1000 г/т (по 250–500 г/т каждого) увеличило конечную живую массу до 3164 г (на 3,2%), улучшило FCR до 1,59 кг/кг (на 3,0–3,1%). Отсутствие протеаз в аналогичном рационе (группа I) снижало продуктивность. Наибольший интегральный эффект достигнут при дозе 1000 г/т: увеличение EPEF на 12,1% (до 432,3). Применение протеаз,

особенно в дозе 1000 г/т, существенно улучшает органолептические качества мяса: увеличение общей дегустационной оценки, нежности (на 18,8% для красного мяса), сочности.

6. Выявлен ключевой физиологический механизм действия экзогенных протеаз – стимуляция эндогенной протеолитической активности в ЖКТ. Введение количества протеаз в дозах 500 и 1000 г/т достоверно увеличивало активность полостных ферментов в химусе тощей и подвздошной кишки на 18–27% и пристеночных пептидаз – на 70,3%, не влияя на синтетическую функцию поджелудочной железы. Это подтверждает причинно-следственную связь между ферментативной активацией, улучшением переваримости и ростом продуктивности.

7. Включение экзогенных протеаз в низкопротеиновые рационы, сбалансированные кристаллическими аминокислотами, достоверно повышает эффективность использования протеина. Доза 500 г/т дала максимальный рост переваримости сырого протеина — до 82,34 %. Азотный баланс заметно улучшился: ретенция азота достигла 66,77 %, эффективность его использования — 69,40 %.

8. Сбалансированные низкопротеиновые рационы с протеазами напрямую снижают азотную нагрузку на окружающую среду. Более полное использование протеина уменьшило экскрецию общего азота с помётом на 10,8 %, а содержание аммонийного азота — на 3,8 %. Причина — рост ретенции азота организмом на 10 % и повышение эффективности его использования до 69,40 %, что на 3 % выше контроля. Падение концентрации азотистых соединений в помёте подтверждает экологическую эффективность стратегии.

9. Производственная апробация низкопротеинового рациона, сбалансированного кристаллическими аминокислотами и комплексом протеаз, подтвердила результат: конечная живая масса выросла на 5,2 %, среднесуточный прирост — на 5,4 %, FCR улучшился на 3,7 %, выход

продукции с единицы производственной площади поднялся на 4,8 %, ЕРЕФ вырос на 6,8 % (до 447,9), сохранность поголовья достигла 97,9 %.

10. Производственная проверка подтвердила высокую экономическую эффективность. За 42-суточный цикл в новом варианте достигнуто увеличение конечной живой массы на 5,2% (3017 г против 2890 г), улучшение FCR на 3,7% (1,57 против 1,60 кг/кг), повышение сохранности до 97,9% и выхода мяса с 1 м² до 65,0 кг. Снижение стоимости комбикорма на 4,1% (24,92 руб./кг против 25,98 руб./кг) при росте производства позволило сократить затраты на корма на 29,1 тыс. руб. и повысить рентабельность по производственной цене на 7,8% и на 9,8% при реализации мяса бройлеров в виде тушек по потребительской цене.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

Для комплексного повышения продуктивности бройлеров, улучшения усвояемости питательных веществ и азотного метаболизма, а также снижения экологической нагрузки на окружающую среду рекомендуется внедрить следующую технологическую стратегию кормления бройлеров:

1. Внедрять низкопротеиновые рационы при снижении уровня сырого протеина в комбикормах на 1,5–2,0 % от рекомендованных норм.
2. Проводить обязательную аминокислотную балансировку, компенсируя снижение протеина прецизионным введением кристаллических аминокислот (лизин, метионин, треонин, валин, изолейцин, аргинин) для достижения идеального протеинового профиля.
3. Применять ферментные комплексы в форме комбинации (КЕМЗАЙМ+ Стеллар про), обогащая комбикорма комплексом протеаз в эффективной дозе от 500 до 1000 г/т (250 и 500 г/т).
4. Для достижения максимальной эффективности гидролиза белка рекомендуется использовать комбинацию протеазных препаратов от разных производителей. Данная стратегия позволяет расширить спектр ферментативной активности и перекрыть оптимальные диапазоны pH на протяжении всего желудочно-кишечного тракта птицы.
5. Проводить контроль качества сырья белкового для оценки переваримости используя методы *in vitro* и применять валидированную методику оценки эндогенных протеаз для контроля их качества.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Перспективными направлениями дальнейших научных изысканий, развивающими положения данной диссертации, представляются: углублённое изучение влияния синергетического комплекса протеаз и аминокислот на микробиоценоз желудочно-кишечного тракта, иммунный статус и морфофункциональное состояние кишечника птицы в условиях применения низкопротеиновых рационов с альтернативными источниками белка.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu H., Wang S., Sorbara J.O., Umar-Faruk M., Cowieson A.J. Novel sfericase protease improves amino acid digestibility of soybean meal and rapeseed meal in broiler chickens. *British Poultry Science*. 2024; 65:137-143. <https://doi.org/10.1080/00071668.2023.2295348>
2. Cowieson A.J., Perez-Maldonado R., Kumar A., Toghyani M. Possible role of available phosphorus in potentiating the use of low-protein diets for broiler chicken production. *Poultry Science*. 2020;99(12):6954-6963. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.045>
3. Liu X., Huang X., Fu Y., Wang Y., Lu Z. The Positive Effects of Exogenous Pancreatin on Growth Performance, Nutrient Digestion and Absorption, and Intestinal Microbiota in Piglets. *Frontiers in Physiology*. 2022; 13:906522. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.906522>
4. Молоканова О.В., Шацких Е.В. Ферментный препарат протеолитического действия в составе комбикорма для цыплят-бройлеров. *Аграрная наука*. 2019;(6):20-22. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-329-6-20-22>
5. Hao X., Zhang G., Ge Y., Wang J., Yang W., Yang L. Effects of low-protein diet supplemented with exogenous protease on growth performance and intestinal health of broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science*. 2025;70(4):147-159. <https://doi.org/10.17221/18/2025-CJAS>
6. Козинец А.И., Надаринская М.А., Капитонова Е.А., Голушко О.Г., Козинец Т.Г., Ковалёва С.А., Гринь М.С. Эффективность снижения количества соевого шрота в составе комбикорма-концентрата КР-1. *Зоотехническая наука Беларуси*. 2024;59(1):200-210.
7. Zuo J., Ling P., He L., Huang W. A meta-analysis of the effects of dietary protease on growth performance, nutrient digestibility, and gut health of weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 2020; 260:114366. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114366>

8. Kebreab E., Liedke A., Caro D., Deimling S., Binder M., Finkbeiner M. Environmental impact of using specialty feed ingredients in swine and poultry production: A life cycle assessment. *Journal of Animal Science*. 2016;94(6):2664-2681. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9036>
9. Shnyder J.F., Huber L.A., Hanshi C. Low-protein diets for broilers: Current knowledge and potential strategies to improve performance and health, and to reduce environmental impact. *Animal Feed Science and Technology*. 2023; 297:115570. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115570>
10. Li P., de Oliveira Sousa T., et al. Use of proteases for animal feed supplementation: scientific and technological updates. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2025;55(7):797-809. <https://doi.org/10.1080/10826068.2025.2465957>
11. Бочкарев А.К. Экономическая эффективность использования минеральных кормовых добавок в рационах свиноматок. *МНИЖ*. 2017;(12-3):66.
12. Анашкина И.И., Кравцова Е.В., Портнова А.В. Получение микробных протеолитических препаратов для переработки отходов зернового производства. *Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология*. 2023;(2).
13. Капитонова Е.А., Чирвинский А.Ю. Эффективность применения отечественных ферментов в яичном птицеводстве. *Зоотехническая наука Беларуси*. 2020;55(1):323-330.
14. Шаабан М., Ананьева Т.В. Результаты анализа российского рынка кормовых добавок. *Овцы, козы, шерстяное дело*. 2023;(3):54-58. <https://doi.org/10.26897/2074-0840-2023-3-54-58>
15. Зинина О.В., Николина А.Д., Хвостов Д.В., Ребезов М.Б., Завьялов С.Н., Ахмедзянов Р.В. Белковый гидролизат как источник биоактивных пептидов в пищевой продукции диабетического питания. *Пищевые системы*. 2023;6(4):440-448. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-4-440-448>

16. Борисовец Д.С., Журавлева Е.С., Зуйкевич Т.А., Красочко П.А., Яромчик Я.П., Морозов А.М., Курбат И.А. Оптимизация состава среды для культивирования штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов. *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. 2020;(2):3-12.
17. Li Y., Wu F., Zhang A., Lu H., Chen Z., Zhang Q. Recent advances in glow-type chemiluminescence: Systems, strategies and analytical applications. *Analytica Chimica Acta*. 2025; 1314:342938. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2025.342938>
18. Fernandes L.M.G., de Carvalho-Silva J., Ferreira-Santos P., Porto A.L.F., Sette L.D., Converti A., Sarubbo L.A. Valorization of agro-industrial residues using *Aspergillus heteromorphus* URM0269 for protease production: Characterization and purification. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;277(3):133323. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133323>
19. Duan W., Wang H., Cheng Q., Zhao Z., Ma Y., Chen Y. Recent advances in microdroplet techniques for single-cell protein analysis. *Analytica Chimica Acta*. 2021; 1181:338808. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338808>
20. Srimathi U., Virivinti N. DFT-guided sustainable extractive fermentation and partial purification of fibrinolytic protease from agro-industrial waste. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2024; 37:101458. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101458>
21. Zhang Q., Yue S., Zhang D., Lu F., Mao S., Qin H.-M. Recent advances in high-throughput droplet-based microfluidic screening platforms for food analysis. *Food Bioscience*. 2024; 62:105570. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105570>
22. Eswayah A.S., Cizauskaite U., Gerber I.C., Holt K.E., Schembri M.A., Allen W.J. Bioluminescence resonance energy transfer biosensor for measuring activity of a protease secreted by *Pseudomonas fluorescens* growing in milk. *Analytica Chimica Acta*. 2023; 1270:341401. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.341401>

23. Fornazier B.G.B., Neto M.A.D., Zavarize K.C., Sakomura N.K., Carneiro L.S., Angel C.R., Pontin V. Research Note: Proteases effect on soybean meal: enzyme product and area of production differences on standardized ileal amino acids digestibility of broiler chickens. *Poultry Science*. 2024;103(12):104398. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104398>
24. Zavelinski V.A.B., et al. The effect of protease supplementation in broiler chicken diets containing maize from different batches on growth performance and nutrient digestibility. *Animal*. 2024;18(12):101363. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.10136>
25. Peñuela-Sierra L.M., et al. Multiprotease improves amino acid release in vitro, energy, and nutrient utilization in broilers fed diets varying in crude protein levels. *Poultry Science*. 2024;103(5):103546. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103546>
26. Sun Y.M., Li X., Zhang D., Bryden W.L. Physical treatment and protease or probiotic supplementation and feather meal digestibility by broilers. *Animal Production Science*. 2024;64(8).
27. Oluwabiyi C.T., Song Z. Branched-chain amino acids supplementation in low-protein broiler diets: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 2024; 317:116114. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.116114>
28. Riddell A., Watson S.P., Bass R.A., Tucker K.L., Wynne C.C., Slater A., Baker-Groberg S.M., Bielecki E., Oglesby I., Sridhar A., Campbell R.A., Phillips K.G., McCarty O.J.T., Unsworth A.J. Protease-activated receptor antagonists prevent thrombosis when dual antiplatelet therapy is insufficient in an occlusive thrombosis microfluidic model. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*. 2022;6(2):100050. <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2022.100050>
29. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
30. Wu H., Qin X., Zhang J., Wu H., Wang X., Wang J., Li C., He H. Biocontrol mechanisms of Bacillus: Improving the efficiency of green agriculture.

Microbial Biotechnology. 2023;16(12):2250-2263. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>

31. Deng L., Wang Z., Yang S., Song J., Que F., Xu H., Zhang H. Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from *Aspergillus* *usamii*. *PLoS ONE*. 2016;11(7):e0160101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160101>

32. Baykara S.G., Kirtel S., Yanıkoğlu E.Ş., Bekler E.Ş., Acer M., Güner Ş., Çetinkaya B., Güven M.Ö., Durak D., Öner E.T. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Thermostable Serine Protease from *Geobacillus* sp. GS53. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2021;193(5):1574-1584. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03512-0>

33. Dunn M.J. (Ed.). *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Bristol, UK: IRL Press at Oxford University Press; 1998. 407 c.

34. Guan H., Diao X., Jiang F., Han J., Kong B. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. *Food Chemistry*. 2018;245:89-96. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.081>

35. Peres Fabbri L., Cavallero A., Vidotto F., Gabriele M. Bioactive Peptides from Fermented Foods: Production Approaches, Sources, and Potential Health Benefits. *Foods*. 2024;13(21):3369. <https://doi.org/10.3390/foods13213369>

36. Du F., Liu Z., Zhu M., Xie Z. A sensitive SDS-PAGE method for detecting proteolytic impurities in enzyme preparations used in the food industry. *Analytical Methods*. 2020;12(8):1072-1079. <https://doi.org/10.1039/C9AY02749J>

37. Ryu S.-M., Kim W., Kim S.-H., Lee H., Lee J.-H., Park D.-J., Kim Y. Evaluation of Probiotic Characteristics of Newly Isolated Lactic Acid Bacteria from Dry-Aged Hanwoo Beef. *Korean Journal of Food Science of Animal Resources*. 2021;41(3):468-480. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e23>

38. García-Carreño F.L., Hernández-Cortés M.P. Use of Protease Inhibitors in Seafood Products. In: Bozari I.S., ed. *Seafood Processing: Technology, Quality*

and Safety. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2014. p. 343-368. <https://doi.org/10.1002/9781118346174.ch14>

39. AOAC International. Official Method 2019.08. Proteolytic Activity of Enzyme Preparations. Titrimetric Method. In: *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 21st ed. Rockville, MD: AOAC INTERNATIONAL; 2019.

40. Bénard C., Gibon Y. Measurement of Enzyme Activities and Optimization of Continuous and Discontinuous Assays. *Current Protocols in Plant Biology*. 2016;1(2):247-262. <https://doi.org/10.1002/cppb.20003>

41. Mhamdi S., Ktari N., Hajji S., Nasri M., Sellami Kamoun A. Alkaline proteases from a newly isolated *Micromonospora chaiyaphumensis* S103: Characterization and application as a detergent additive and for chitin extraction from shrimp shell waste. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;94(Pt A):415-422. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.036>

42. Sareen R., Bornscheuer U., Mishra P. A microtiter plate assay for the determination of the synthetic activity of protease. *Analytical Biochemistry*. 2004;333(1):193-195. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.043>

43. Borodinskaia I.N., Mishunin I.F. Metody opredeleniia aktivnosti proteoliticheskikh fermentov [Methods of determining the activity of proteolytic enzymes]. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal*. 1988;60(2):105-119. (In Russ.)

44. Ong I.L.H., Yang K.L. Recent developments in protease activity assays and sensors. *Analyst*. 2017;142(11):1867-1881. <https://doi.org/10.1039/c6an02647h>

45. Nadar S.S., Pawar R.G., Rathod V.K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;101:931-957. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055>

46. Ortiz G.E., Nosedá D.G., Ponce Mora M.C., Recupero M.N., Blasco M., Albertó E. A Comparative Study of New *Aspergillus* Strains for Proteolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation. *Enzyme Research*. 2016;2016:3016149. <https://doi.org/10.1155/2016/3016149>

47. Pokrzywa P., Cieřlik E., Surma M. Effect of storage conditions on the formation of type A and B trichothecenes in cereal products. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2019;26(2):260-265. <https://doi.org/10.26444/aaem/103398>
48. Lessinger J.-M., Ferrard G., Grafmeyer D., Boursier G., Bretauiere J.-P., Dumont G., Franzini C., Schiele F. Validation of an enzyme calibrator-an IFCC guideline. *Clinical Biochemistry*. 1998;31(6):435-445. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(98\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(98)00039-3)
49. Kozlov I.A., Melnyk P.C., Hachmann J.P., Srinivasan A., Shults M., Zhao C., Musmacker J., Nelson N., Barker D.L., Lebl M. A high-complexity, multiplexed solution-phase assay for profiling protease activity on microarrays. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2008;11(1):24-35. <https://doi.org/10.2174/138620708783398304>
50. Wang Y., Lin Y., Chen Q., Hsieh Y., Utama R.H., Wang J. A High-Throughput Microfluidic Approach for 100-Fold Rapid Kinetics Screening of Protease Inhibitors. *Lab on a Chip*. 2022;22(4):801-810. <https://doi.org/10.1039/D1LC00988G>
51. Jambunathan K., Watson D.S., Kodukula K., Galande A.K. Proteolytic fingerprinting of complex biological samples using combinatorial libraries of fluorogenic probes. *Current Protocols in Protein Science*. 2012;Chapter 21:21.22.1-21.22.14. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2122s70>
52. Gruber P., Marques M.P.C., Sulzer P., Wohlgemuth R., Mayr T., Baganz F., Szita N. Real-time pH monitoring of industrially relevant enzymatic reactions in a microfluidic side-entry reactor (μ SER) shows potential for pH control. *Biotechnology Journal*. 2017;12(6). <https://doi.org/10.1002/biot.201600475>
53. Rajendhran H.P., Vaidyanathan V.K., Venkatraman S., Karthik P. Optimization of Enzymatic Hydrolysis by Protease Produced from *Bacillus subtilis* MTCC 2423 to Improve the Functional Properties of Wheat Gluten Hydrolysates. *International Journal of Food Science*. 2024; 2024:5053510. <https://doi.org/10.1155/2024/5053510>

54. Ming Y., Wang W., Yin R., Zeng M., Tang L., Tang S., Li M. A review of enzyme design in catalytic stability by artificial intelligence. *Briefings in Bioinformatics*. 2023;24(3): bbad065. <https://doi.org/10.1093/bib/bbad065>
55. Солопченко Г.Н. Области эффективного применения статистических методов обработки результатов многократных измерений. *Измерительная техника*. 2016;(5):20-26.
56. Fu X., Zhang Y., Xu Q., Sun X., Meng F. Recent Advances on Sorting Methods of High-Throughput Droplet-Based Microfluidics in Enzyme Directed Evolution. *Frontiers in Chemistry*. 2021; 9:666867. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.666867>
57. Wise S.A. What if using certified reference materials (CRMs) was a requirement to publish in analytical/bioanalytical chemistry journals *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(24):7015-7022. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04163-8>
58. Lemke N., El-Khatib A.H., Tchipilov T., Jakubowski N., Weller M.G., Vogl J. Procedure providing SI-traceable results for the calibration of protein standards by sulfur determination and its application on tau. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022; 414:2535-2544. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04023-5>
59. Wei M., Chen P., Zheng P., Tao X., Yu X., Wu D. Purification and characterization of aspartic protease from *Aspergillus niger* and its efficient hydrolysis applications in soy protein degradation. *Microbial Cell Factories*. 2023;22(1):42. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02047-9>
60. Thompson M., Ellison S.L.R., Wood R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2002;74(5):835-855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>
61. Day L., Cakebread J.A., Loveday S.M. Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food*

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.101967>

62. Tavano O.L., Berenguer-Murcia A., Secundo F., Fernandez-Lafuente R. Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17(2):412-436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>

63. Loveday S.M. Food proteins: technological, nutritional, and sustainability attributes of traditional and emerging proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2020; 11:119-140. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051653>

64. Brodkorb A., Egger L., Alming M., Alvito P., Assunção R., Ballance S., Bohn T., Bourlieu-Lacanal C., Boutrou R., Carrière F., Clemente A., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Edwards C., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A.R., Martins C., Marze S., McClements D.J., Ménard O., Minekus M., Portmann R., Santos C.N., Souchon I., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Recio I. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*. 2019;14(4):991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

65. Nishinari K., Fang Y., Guo S., Phillips G.O. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification. *Food Hydrocolloids*. 2014; 39:301-318. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.013>

66. Du M., Xie J., Gong B., Xu X., Tang W., Li X., Li C., Sun W. Extraction, physicochemical characteristics and functional properties of Mung bean protein. *Food Hydrocolloids*. 2018; 76:131-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.01.003>

67. Tanger C., Engel J., Kulozik U. Influence of extraction conditions on the conformational alteration of pea protein extracted from pea flour. *Food Hydrocolloids*. 2020; 107:105949. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105949>

68. Meng Y., Li C. Conformational changes and functional properties of whey protein isolate-polyphenol complexes formed by non-covalent interaction.

- Food Chemistry*. 2021; 364:129622.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129622>
69. Qi P.X., Onwulata C.I. Physical properties, molecular structures, and protein quality of texturized whey protein isolate: effect of extrusion temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(8):4668-4675.
<https://doi.org/10.1021/jf104258x>
70. Jingwang C., Mu T., Zhang M., Goffin D. Effect of heat treatments on the structure and emulsifying properties of protein isolates from cumin seeds (*Cuminum cyminum*). *Food Science and Technology International*. 2018;24(8):1082013218788753. <https://doi.org/10.1177/1082013218788753>
71. Chemat F., Zill-e-Huma, Khan M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2011;18(4):813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
72. Sari Y.W., Mulder W.J., Sanders J.P., Bruins M.E. Towards plant protein refinery: Review on protein extraction using alkali and potential enzymatic assistance. *Biotechnology Journal*. 2015;10(8):1138-1157.
<https://doi.org/10.1002/biot.201400569>
73. Wang F., Liu L., Wang Y., Yang B. Optimization of protease activity from *Bacillus subtilis* GS-1 and potential applications in protein hydrolysis. *Zhongshan Daxue Xuebao/Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*. 2012;51(4):79-86, 91.
74. Potenza L., Kozon L., Drewniak L., Kaminski T.S. Passive Droplet Microfluidic Platform for High-Throughput Screening of Microbial Proteolytic Activity. *Analytical Chemistry*. 2024;96(40):15931-15940.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c02979>
75. Sarwar Gilani G., Wu Xiao C., Cockell K.A. Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *British Journal of Nutrition*. 2012;108(Suppl 2): S315-S332. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002371>

76. Acar T., Arayici P.P., Kahan M., Akdeste Z.M. post-translational modifications of proteins. In: *Applications of Molecular Genetics in Personalized Medicine*. OMICS Group eBooks; 2015. p. 14.
77. Saudagar P., Tripathi T., eds. *Advanced Spectroscopic Methods to Study Biomolecular Structure and Dynamics*. 1st ed. Academic Press, Elsevier; 2022. <https://doi.org/10.1016/C2021-0-01551-0>
78. Nicze M., Borówka M., Dec A., Niemiec-Górska A. The Current and Promising Oral Delivery Methods for Protein- and Peptide-Based Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(2):815. <https://doi.org/10.3390/ijms25020815>
79. Ndochinwa G.O., Wang Q.Y., Okoro N.O., Amadi O.C., Nwagu T.N., Nnamchi C.I., Moneke A.N., Odiba A.S. New advances in protein engineering for industrial applications: Key takeaways. *Open Life Sciences*. 2024;19(1):20220856. <https://doi.org/10.1515/biol-2022-0856>
80. Фисинин В.И., Вертипрахов В.Г., Грозина А.А., Свиткин В.С. Методы изучения кишечного пищеварения у сельскохозяйственной птицы. *Вестник российской сельскохозяйственной науки*. 2025;(5):25-27. <https://doi.org/10.31857/vrsn/2017/5/25-27>
81. Bryan D.D.S.L., Classen H.L. In Vitro Methods of Assessing Protein Quality for Poultry. *Animals*. 2020;10(4):551. <https://doi.org/10.3390/ani10040551>
82. Zheng A., Zhang A., Chen Z., Pirzado S.A., Chang W., Cai H., Bryden W.L., Liu G. Molecular mechanisms of growth depression in broiler chickens (*Gallus Gallus domesticus*) mediated by immune stress: a hepatic proteome study. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2021;12(1):90. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00591-1>
83. Толкачева А.А., Черенков Д.А., Корнеева О.С., Пономарев П.Г. Ферменты промышленного назначения – обзор рынка ферментных препаратов и перспективы его развития. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. 2017;79(4):197-203. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-4-197-203>

84. Ловцова Л.Г. *Биохимия: краткий курс лекций для студентов 4 курса направления подготовки 19.03.01 «Биотехнология»*. Саратов: ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ»; 2016. 104 с.

85. Yang S.I., Furuse M., Muramatsu T., Okumura J. Responses of the pancreatic digestive enzyme secretion to various combinations of amino acids and cholecystokinin in chicks (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1989;93(4):703-706. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(89\)90488-x](https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90488-x)

86. Ланцева Н.Н., Ануфриева Н.В. Использование кормового средства «Белуга» в птицеводстве. *Инновации и продовольственная безопасность*. 2017;(4):9-13. <https://doi.org/10.31677/2311-0651-2017-0-4-9-13>

87. Нестеренко З.В., Хавкин А.И., Новикова В.Н., Листопадова А.П. Кишечная микробиота и болезни сердечно-сосудистой системы. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2022;(3):125-133. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-199-3-125-133>

88. Вертипрахов В.Г., Грозина А.А., Долгорукова А.М. Активность ферментов поджелудочной железы у цыплят-бройлеров на разных этапах пищеварения. *Сельскохозяйственная биология*. 2016;51(4):509-515. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.4.509>

89. Tsutsui K., Ubuka T., Yin H., Osugi T., Ukena K., Bentley G.E., Ciccone N., Inoue K., Chowdhury V.S., Sharp P.J., Wingfield J.C. Mode of action and functional significance of avian gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): a review. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 2006;305(9):801-806. <https://doi.org/10.1002/jez.a.305>

90. Алейник В.А., Бабич С.М. Концепция ферментативной дезинтеграции питательных веществ в верхнем отделе желудочно-кишечного тракта. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023;(9):56-67. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-217-9-56-67>

91. Foltyn M., Lichovnicková M., Rada V., Musilová A. Apparent ileal digestibility of protein and amino acids in protein feedstuffs and trypsin activity in

the small intestine in broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science*. 2015;60(8):375-382. <https://doi.org/10.17221/8407-CJAS>

92. Лунегов А.М., Лунегова И.В., Рожков К.А., Шпаковская Ю.С. Переваримость питательных веществ рациона при использовании кормовой добавки «Пуляр». *Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии*. 2022;(4):146-149. <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2022.4.146>

93. Налетова Л.А. Некоторые морфологические показатели мускульного отдела желудка кур и гусей. *Вестник Бурятского государственного университета. Биология. География*. 2017.

94. Чопорова Н.В., Шубина Т.П. Возрастная морфология желудка норок при различной степени двигательной активности. *Ветеринарная патология*. 2014;(1):39-45.

95. Пенджиев А.М., Абдуллаев А. Агротехника выращивания дынного дерева в солнечных теплицах и получения протеолитических ферментов для медицинской промышленности. *Альтернативная энергетика и экология (ISJAE)*. 2014;(6):50-65.

96. Просекова Е.А., Панов В.П., Серякова А.А., Комарчев А.С., Воронин К.О. Рост и морфофизиологическое состояние органов пищеварения бройлеров при использовании кормовой добавки «Фарматан» (Бутитан). *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2020;(6):34-48. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2020-6-34-48>

97. Хамитова В.З., Османян А.К., Малородов В.В. Эффективность выращивания бройлеров в зависимости от схем фазового кормления и использования суперпрестартерного рациона. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2021;(4):79-93. <https://doi.org/10.26897/0021-342X-2021-4-79-93>

98. Дускаев Г.К., Казачкова Н.М., Рахматуллин Ш.Г., Инчагова К.С. Использование QUERCUSCORTEX в сочетании с ферментами в рационе цыплят-бройлеров. *Вестник Курганского ГСХИ*. 2019;(3):38-41.

99. Ковалёва И.В., Поддубная О.В. *Химия. Биохимия пищеварения: курс лекций*. Горки: БГСХА; 2019. 76 с.
100. Almonte A., Qadri H., Sultan F., Watson J., Mount D., Rumbaugh G., Sweatt J. Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity. *Journal of Neurochemistry*. 2013;124(1):109-122. <https://doi.org/10.1111/jnc.12075>
101. Грозина А.А. К вопросу о химическом составе панкреатического сока кур. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2019;(1):146-153.
102. Vertiprakhov V.G., Fisinin V.I., Grozina A.A., Ovchinnikova E.A. Trypsin cycling in poultry is associated with metabolic regulation. *Frontiers in Physiology*. 2023;14:1226546. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1226546>
103. Аюрзанаева М.В., Санжиева С.Е. Суточный объем панкреатического сока птиц. *Вестник Бурятского государственного университета. Биология. География*. 2009;(4).
104. Chia E., Kagota S., Wijekoon E., McGuire J. Protection of protease-activated receptor 2 mediated vasodilatation against angiotensin II-induced vascular dysfunction in mice. *BMC Pharmacology*. 2011; 11:10. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-11-10>
105. Яровая Г.А., Блохина Т.Б., Нешкова Е.А. Протеиназа-активируемые рецепторы (PARs) – сигнальный путь, инициируемый ограниченным протеолизом. *Лабораторная медицина*. 2009;(10):23-34.
106. Крюков В.С., Зиновьев С.В., Некрасов Р.В. Протеазы в питании моногастричных животных. *Аграрная наука*. 2021;344(1):30-38. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-344-1-30-38>
107. Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Андреева Л.А. Влияние пептидов KKRRPGP (Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro) и KRRKPGP (Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro) на параметры гемостаза, липидный профиль, уровень глюкозы крови и изменение массы

тела крыс на фоне метаболического синдрома и дисфункции эндотелия. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2021;76(1):10-17.

108. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. М.: Адвансед Солюшнз; 2012. 160 с.

109. Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Морковин Е.И., Стрыгин А.В., Горбунова Ю.В., Волотова Е.В., Макаренко И.Е., Сапарова В.Б., Драй Р.В., Петров В.И. Физиология, фармакология и перспективы применения ингибиторов дипептидилпептидазы-4. *Фармация и фармакология*. 2023.

110. Зайко О.А. Содержание макро- и микроэлементов в печени свиней скороспелой мясной породы (СМ-1) в сыворотке крови. *Доклады РАСХН*. 2013;(5):51-53.

111. Деев Р.В., Ахмедов Т.А., Бозо И.Я., Фадеев В.А. Структурно-временная схема преобразований кишечного эпителия в мочевых резервуарах. *Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова*. 2010;(4).

112. Домшке С., Контурек С., Домшке В. Роль «вторичного передатчика» во внешнесекреторной функции поджелудочной железы. *Физиологический журнал СССР*. 1981; 68:423-430.

113. Вертипрахов В.Г. *Физиология кишечного пищеварения у кур (экспериментальный подход)*. М.: ООО «КнигИздат»; 2023.

114. Смолин С.Г. *Физико-химические показатели и активность ферментов сока поджелудочной железы у кур, свиней и собак: монография*. Красноярск: Красноярский государственный аграрный университет; 2008. 155 с.

115. Kwon J., Cho H., Kim S., Ryu Y., Lee J.J. A combination strategy of solubility enhancers for effective production of soluble and bioactive human enterokinase. *Journal of Biotechnology*. 2021; 340:57-63.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.002>

116. Клемешова И.Ю., Алексеева З.Н., Реймер В.А., Гавриленко А.Ю., Шмакова Е.В., Чебаков В.П., Швыдков А.Н. Влияние разных рационов на действие молочно-кислой добавки при выращивании цыплят-бройлеров. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2015;(2):85-89.

117. Тарабанова Е.В., Алексеева З.Н., Реймер В.А. Изменения микробиоценоза кишечника цыплят при введении в рацион серебряного нанобиокомпозита. *Вестник НГАУ*. 2011;(1):83-87.

118. Швыдков А.И., Ланцева Н.Н., Рябуха Л.А. *Физиологическое обоснование использования пробиотиков, симбиотиков и природных минералов в бройлерном производстве Западной Сибири. Ч. 1: Комплексная характеристика молочно-кислой кормовой добавки: монография*. Новосибирск: Новосибирский государственный аграрный университет; 2015. 148 с.

119. Кудряшова Т.А., Виноградова Т.А., Козьякова Н.Н. Сравнение методов оценки технологического качества льноволокнистой продукции. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2022;52(1):25-36. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2022-1-3>

120. Фролов В.Ю., Сысоев Д.П., Класнер Г.Г., Горб С.С. Классификация способов инактивации антипитательных веществ. *World science*. 2016;4(8).

121. Витол И.С., Мелешкина Е.П. Протеолитические ферменты и их белковые ингибиторы из зерна тритикале. *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2018;(3):36-45.

122. Cruz-Casas D.E., Aguilar C.N., Ascacio-Valdés J.A., Rodríguez-Herrera R., Chávez-González M.L., Flores-Gallegos A.C. Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*. 2021; 3:100047. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>

123. Коротько Г.Ф. Рециркуляция ферментов пищеварительных желез. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2011;21(4):14-21.

124. Андрианова Е.Н., Егоров И.А., Пронин В.В. Эффективность и физиологическая безопасность гороха в рационах кур-несушек (*Gallus gallus* L.) родительского стада на поздних сроках содержания. *Сельскохозяйственная биология*. 2020;55(6):1245-1256.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.6.1245rus>

125. Фомичева Н.В., Рабинович Г.Ю., Прутенская Е.А., Смирнова Ю.Д. Микробиологическая оценка процесса ускоренной твердофазной ферментации органического сырья. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021;11(2):236-243. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-2-236-243>

126. Филькин С.Ю., Липкин А.В., Федоров А.Н. Использование рекомбинантных белков в современной пищевой биотехнологии: обзор предметного поля. *FOOD METAENGINEERING*. 2024;2(2):47-74.
<https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.46>

127. Байков М.В. Структура кормовой базы шмелей рода *Bombus* Latr. (Hymenoptera: Apidae) в лесных биотопах Ленинградской области. *Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии*. 2023;(244):244-259.
<https://doi.org/10.21266/2079-4304.2023.244.244-259>

128. Корягина А.О., Рудакова Н.Л., Лутфуллин М.Т., Хадиева Г.Ф., Тойменцева А.А., Марданова А.М., Шарипова М.Р. Протеиназа бацилл на основе генной конструкции как кормовая добавка для птицеводства. *Сельскохозяйственная биология*. 2018;(6).

129. Махова А.А., Минаев М.Ю., Куликовский А.В., Вострикова Н.Л. Изучение ферментативной активности рекомбинантной металлопептидазы, предназначенной для применения в мясной промышленности. *Вопросы питания*. 2019;88(4):95-104. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10047>

130. Буряков Н.П., Егоров И.А., Щукина С.А., Горст К.А. Лизин и валин в кормлении птиц. – М.: РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2023. – 202 с.

131. Dei H.K. Advances in Poultry Nutrition Research – A Review. 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95990>

132. Крючков И.А., Никишов А.А. Влияние белкового концентрата из личинок черной львинки *Hermetia illucen* на продуктивные показатели цыплят-бройлеров. *Аграрная наука*. 2025;1(4):108-112. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-393-04-108-112>

133. Журавлев М.С., Вертипрахов В.Г., Кошечева М.В., Буряков Н.П., Смаглюк М.И., Истомин А.И. Стандартизированная илеальная усвояемость аминокислот белкового концентрата на основе личинок мух *Lucilia* spp. (Diptera: Calliphoridae) и его влияние на показатели крови у цыплят-бройлеров (*Gallus gallus* L.) // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55. – № 6. – С. 1233–1245. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.6.1233rus>

134. Хамви М.Н. Аминокислотное питание и метаболизм у цыплят-бройлеров. В: Международная научная конференция молодых учёных и специалистов, посвящённая 160-летию Тимирязевской академии: Сборник статей. Москва, 02–04 июня 2025 года. М.: Российский государственный аграрный университет; 2025. с. 198-201.

135. Hamwi M.N. Growth performance of broiler chickens on Animal and vegetable diets. *Scientific Journal of Young Scientists*. 2024;3(38):22-25.

136. Буряков Н.П., Щукина С.А., Горст К.А. Кормовая добавка синтетического L-валина в комбикормах для цыплят-бройлеров // Доклады ТСХА. – 2024. – № 296. – С. 105–110.

137. Хамви М.Н. Эффективность использования протеазы в кормлении цыплят-бройлеров. В: *Материалы Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 150-летию со дня рождения А.Я. Миловича: Сборник статей*. Москва, 03–05 июня 2024 года. М.:

Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева; 2024. с. 233-236.

138. Красноярова Б.А., Назаренко А.Е., Плуталова Т.Г., Шарабарина С.Н. Особенности оценки углеродного следа в сельском хозяйстве: сравнительный анализ методических подходов. *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки*. 2024;(1).

139. Kim W.K., Singh A.K., Wang J., Applegate T. Functional role of branched chain amino acids in poultry: a review. *Poultry Science*. 2022;101(5):101715. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101715>

140. Tilley J.M.A., Terry R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*. 1963;18(2):104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>

141. Adedokun S.A., Adeola O., Parsons C.M., Lilburn M.S., Applegate T.J. Standardized ileal amino acid digestibility of plant feedstuffs in broiler chickens and turkey poults using a nitrogen-free or casein diet. *Poultry Science*. 2008; 87:2535-2548. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00387>

142. Bryan D.D.S.L., Abbott D.A., Classen H.L. Digestion kinetics of protein sources determined using an in vitro chicken model. *Animal Feed Science and Technology*. 2019; 248:106-113. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.002>

143. Мирошников С.А., Гарипова Н.В., Холодилина Т.Н., Курилкина М.Я., Дускаев Г.К. Продуктивное действие и переваримость кормов при использовании в кормлении птицы микрочастиц железа. *Животноводство и кормопроизводство*. 2018;(2):2-8.

144. Cowieson A.J., Kluentner A.M. Contribution of exogenous enzymes to potentiate the removal of antibiotic growth promoters in poultry production. *Animal Feed Science and Technology*. 2017; 250:81-92. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.12.005>

145. Пахомов В.И., Брагинец С.В., Бахчевников О.Н., Алферов А.С., Рудой Д.В. Технологии экструдирования кормов и продуктов питания,

включающих биомассу насекомых (обзор). *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2020;21(3):233-244. <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2020.21.3.233-244>

146. Coffey D., Dawson K., Ferket P., Connolly A. Review of the feed industry from a historical perspective and implications for its future. *Journal of Applied Animal Nutrition*. 2016;4(e3):1-11. <https://doi.org/10.1017/jan.2015.11>

147. Rojas O.J., Stein H.H. Effects of reducing the particle size of corn grain on the concentration of digestible and metabolizable energy and on the digestibility of energy and nutrients in corn grain fed to growing pigs. *Livestock Science*. 2015; 181:187-193. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.013>

148. Казакова Е.Ф., Ган Е.А., Костюк Н.И., Бурко А.Н., Барсукова М.В. Методы, альтернативные экспериментам на животных, в научной и производственной практике (обзор). *Экология и животный мир*. 2020;(1):47-52.

149. Olukosi O.A., Beeson L.A., Englyst K., Romero L.F. Effects of exogenous proteases without or with carbohydrases on nutrient digestibility and disappearance of non-starch polysaccharides in broiler chickens. *Poultry Science*. 2015;94(11):2662-2669. <https://doi.org/10.3382/ps/pev260>

150. Попов В.В. Насущные проблемы стандартизации и оценки качества и питательности кормов. *Адаптивное кормопроизводство*. 2022;2021(4):77-89. <https://doi.org/10.33814/AFP-2222-5366-2021-4-77-89>

151. Slominski B.A. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science*. 2022;101(1):101588. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101588>

152. Ravindran V., Hew L.I., Ravindran G., Bryden W.L. A comparison of ileal digesta and excreta analysis for the determination of amino acid digestibility in food ingredients for poultry. *British Poultry Science*. 1999;40(2):266-274. <https://doi.org/10.1080/00071669987692>

153. Wang X., Parsons C.M. Effect of raw material source, processing systems, and processing temperatures on amino acid digestibility of meat and bone meals. *Poultry Science*. 1998;77(6):834-841. <https://doi.org/10.1093/ps/77.6.834>
154. Мезенова О.Я. Современная пищевая биотехнология: основные проблемы и вызовы. *Вестник МАХ*. 2023;(1):5-11.
155. Liu S.Y., Selle P.H., Cowieson A.J. Strategies to enhance the performance of pigs and poultry on sorghum-based diets. *Animal Feed Science and Technology*. 2013;181(1-4):1-14.
156. ГОСТ Р 55987-2014. *Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения переваримости in vitro*. М.: Стандартинформ; 2015. 12 с.
157. Boisen S., Fernández J.A. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. *Animal Feed Science and Technology*. 1997;68(3-4):277-286. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00058-8)
158. Ismail B.P., Nielsen S.S. Protein Nitrogen Determination. In: Ismail B.P., Nielsen S.S., eds. *Nielsen's Food Analysis Laboratory Manual*. Food Science Text Series. Cham: Springer; 2024. https://doi.org/10.1007/978-3-031-44970-3_16
159. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures – Scientific guideline (EMA/CHMP/ICH/804363/2022). [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf
160. Балаян В.М., Левницкий А.П. Методика определения протеолитической активности пищеварительных ферментов. В: *Биохимические методы исследования в животноводстве*. М.: Колос; 1984. с. 56-62.
161. Aviagen. *Ross 308: Broiler Management Handbook*. Huntsville, AL: Aviagen Group; 2022. 112 p.
162. Aviagen. *Ross 308: Broiler Nutrition Specifications*. Huntsville, AL: Aviagen Group; 2022. 45 p.

163. Фисинин В.И., Егоров И.А., Околелова Т.М., ред. *Методические рекомендации по кормлению сельскохозяйственной птицы*. Сергиев Посад: ВНИТИП; 2021. 248 с.
164. ВНИТИП. *Органолептическая оценка качества продуктов убоя птицы: Методические указания*. Сергиев Посад; 2019. 18 с.
165. *Инструкция по эксплуатации автоматического биохимического анализатора Sapphire-400*. Токио: Japan Electronics Inc.; 2019. 89 с.
166. ВНИТИП. *Методика определения мясной продуктивности птицы (анатомическая разделка)*. Сергиев Посад; 2020. 24 с.
167. ВНИТИП. *Методика расчета экономической эффективности применения новых кормов и добавок в птицеводстве*. Сергиев Посад; 2022. 31 с.
168. Плохинский Н.А. *Биометрия*. М.: Изд-во МГУ; 2019. 368 с.
169. ГОСТ 13496.4-2019. *Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина*. М.: Стандартинформ; 2020. 14 с.
170. ГОСТ 13496.15-2016. *Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения содержания сырого жира*. М.: Стандартинформ; 2017. 10 с.
171. ГОСТ 13496.2-2018. *Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания сырой клетчатки*. М.: Стандартинформ; 2019. 12 с.
172. ГОСТ 13979.3-2018. *Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения содержания золы*. М.: Стандартинформ; 2019. 8 с.
173. ГОСТ 13979.1-2018. *Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения влаги*. М.: Стандартинформ; 2019. 9 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза

ГОСТ – государственный стандарт

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

КП – кормовые протеазы

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МКМ – мясокостная мука

НИЦ – научно-исследовательский центр

ПП – переваримость протеина

ПСВ – переваримость сухого вещества

СВ – сухое вещество

СП – сырой протеин

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ADG – среднесуточный прирост живой массы (Average Daily Gain)

АОАС – Ассоциация официальных аналитических химиков (Association of Official Analytical Chemists)

AU – Ансоновская единица активности протеаз (Anson Unit)

BAPNA – бензоил-аргинин-п-нитроанилид (синтетический хромогенный субстрат для определения активности трипсина)

BCAA – аминокислоты с разветвлённой боковой цепью (Branched-Chain Amino Acids)

BCR – Бюро стандартных образцов Европейского Сообщества (Bureau Communautaire de Référence)

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота (хелатирующий агент)

EPF – Европейский индекс эффективности производства (European Production Efficiency Factor)

EU – Европейский Союз (European Union)

FCR – коэффициент конверсии корма (Feed Conversion Ratio)

FIP (U) – Международная фармакопейная единица активности протеаз (Fédération Internationale Pharmaceutique)

HUT – гемоглобиновая единица по тирозиновой основе (Hemoglobin Unit Tyrosine basis)

IPPC – Директива о комплексном предотвращении и контроле загрязнений (Industrial Emissions Directive)

ISO – Международная организация по стандартизации (International Organization for Standardization)

NIST – Национальный институт стандартов и технологий (США)

SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия

TN – общий азот (Total Nitrogen)

USP – единица активности по стандартам Фармакопеи США (United States Pharmacopeia)