На втором этапе исследований были взяты концентрации от 1000,0 мг/л до 23425,6 мг/л. Концентрация 1000,0 мг/л (I опытная группа) вызывала незначительные нарушения в клиническом статусе особей молоди стерляди. У рыб этой группы отмечали замедление плавательных движений. Некоторые особи залегали на дно аквариума. Во II опытной группе наблюдалась аналогичная клиническая картина, но нарушение плавательных движений было выражено значительно, особи то замедляли движения, то совершали круговые движения, через 96 часов с момента начала опыта зарегистрировали гибель одной рыбы. Особые изменения отмечены в III опытной группе, помимо того, что особи были малоподвижными, у них отмечали нарушения плавательных и жаберных движений. Через 96 часов отмечен падеж пяти особей из десяти, задействованных в опыте.

При концентрации в количестве 10648,0 мг/л (IV опытная группа) рыба была малоподвижна, отмечены нарушения плавательных и жаберных движений, которые уже отмечались через 24 часа от начала эксперимента. Зарегистрирована гибель восьми особей рыб через 48 часов

Концентрация 23425,6 мг/л вызвала гибель особей стерляди уже через 24 часа от начала опыта. Предварительно были отмечены явные клинические признаки интоксикации, рыба практически не двигалась, через 24 часа произошла гибель всех десяти особей.

Выводы. В результате определения острой токсичности на рыбах установлена концентрация кобаметина (LC_{50}) для молоди стерляди, которая составила 4840,0 мг/л. Согласно общепринятым классификациям опасности химических веществ для водных организмов, вещества с летальной концентрацией (LC) больше 1000,0 мг/л считаются малотоксичными.

Список литературы

1. Абросимова Н. А. Влияние фракционного состава углеводов на рост и выживаемость личинок осетра в раннем постэмбриогенезе / Н. А. Абросимова, Е. М. Саенко, Е. Г. Белов // Тез. докладов IV Всер. конф. по раннему онтогенезу рыб, Мурманск. – 2018. – Ч.1. – С. 1–2.

2. Влияние ультрадисперсных кормовых добавок, пробиотических штаммов и их комплексов на содержание эссенциальных микроэлементов в организме карпа / А. Е. Аринжанов, Е. П. Мирошникова, А. Н. Сизенцов, Ю. В. Килякова // Микроэлементы в медицине. – 2021. – Т. 22. – № S1. – С. 9–10.

3. Семененко М. П. Оценка общетоксических свойств препарата ДОН-1 в рамках доклинической безопасности для теплокровных животных / М. П. Семененко, А. В. Басанкин, К. А. Семененко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2024. – № 2(66). – С. 111–116.

3. Sturgen diseases risks in closed water supply facilities and possible approaches to pharmacotherapy and prevention / V. Basankina, I. Kaloshkina, A. Basankin [et al.] // BIO Web of Conferences. – 2024. – Vol. 138. – P. 01002.

DOI: 10.48612/sbornik-2026-1-81
УДК 543.068.8:636.087.7

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ

Нестеренко Ирина Сергеевна, канд. хим. наук
Бакай Кристина Александровна
Мухамедова Лилия Дамировна
Прийма Анастасия Дмитриевна
Сафронова Валентина Андреевна, канд. хим. наук
ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных
средств для животных и кормов»,
г. Москва, Российская Федерация

Разработана методика на основе титриметрии для определения активности липазы в кормовых добавках. Диапазон измерения активностей составил от 100 до 100 000 мкмоль/(мин·г). Подобраны условия определения липазной активности: pH раствора, время и температура проведения реакции, состав и концентрация субстрата. Проведена оценка активности липазы в зарегистрированных кормовых добавках с разным значением активностей по разработанной методике и показано, что полученные значения согласуются с заявленными показателями.

Ключевые слова: кормовые добавки; липаза; ферментативная активность

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINATION LIPASE ACTIVITY IN FEED ADDITIVES

Nesterenko Irina Sergeevna, PhD Chem. Sci.
Bakai Kristina Aleksandrovna
Mukhamedova Liliya Damirovna
Priima Anastasiia Dmitrievna
Safronova Valentina Andreevna, PhD Chem. Sci.
The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, Russian Federation

A titrimetric-based method for determining lipase activity in feed additives was developed. The activity measurement range was 100 to 100,000 μmol/(min·g). Lipase activity determination conditions were selected, including solution pH, reaction time and temperature, and substrate composition and concentration. A significant effect of the desorption stage on sorption capacity was demonstrated. Lipase activity in registered feed additives with different activity values was assessed using the developed method, and the obtained values were found to be consistent with the stated parameters.

Keywords: feed additive; lipase; enzyme activity

В настоящее время в сельском хозяйстве активно применяются кормовые добавки с содержанием ферментов для повышения перевариваемости кормов и усвояемости питательных веществ. Наибольшее распространение получили карбогидразы, такие как глюканаза, целлюлаза и ксиланаза – для расщепления полисахаридов, липазы – для расщепления жиров и фитаза – для улучшения усвоения фосфора. Липазы – это ферменты, относящиеся к классу гидролаз (гидролаза сложных эфиров глицерина, Е.С. 3.1.1.3) [5], которые воздействуют на сложноэфирные связи нескольких соединений, при этом ацилглицерины являются наиболее подходящими субстратами. Липазы катализируют реакции гидролиза, ацидолиза, переэтерификации и др. Они являются более активными в отношении нерастворимых субстратов, особенно триглицеридов, состоящих из длинноцепочечных жирных кислот с более чем 10 атомами углерода [1, 7].

Для определения липазной активности разработаны разнообразные методы, которые можно разделить на три большие группы: количественное определение образующихся жирных кислот титриметрическими или радиометрическими методами; определение высвобождающегося окрашенного или флуоресцирующего продукта фотометрическими методами; определение изменения биофизических свойств субстрата во время липолиза кондуктометрическими, турбидиметрическими, денситометрическими или микроскопическими методами [2, 4, 6].

Наиболее часто применяют спектрофотометрический и титриметрический методы. Для проведения спектрофотометрического метода требуется наличие дорогостоящего субстрата с п-нитрофенилом. Также данный субстрат не относится к классу триглицеридов, поэтому его использование может быть нецелесообразным. Метод, основанный на титровании жирных кислот намного проще в исполнении, не требует сложного и дорогостоящего оборудования. Титриметрический метод основан на количественном определении карбоновых кислот, выделяющихся из различных типов сложных эфиров, с помощью гидролитической активности липаз.

Данные методы делят на три группы: определение свободных жирных кислот после экстракции, конечное титрование и непрерывное титрование. Они просты в реализации, не требуют сложного оборудования, но сложность фиксации перехода окраски индикатора может приводить к неправильным результатам анализа.

Анализ литературных данных показывает, что для определения липазной активности не существует универсальной методики, которая позволяла проводить анализ бы с достаточной точностью за короткий промежуток времени. Каждый из рассмотренных методов обладает недостатками, поэтому целью данной работы было разработать универсальную методику, позволяющую определять липазную активность в кормовых добавках.

Методика исследований. Определение липазной активности в кормовых добавках проводили следующим образом. К предварительно прогретому до 37 °С раствору субстрата добавляли раствор экстракта кормовой добавки. Ровно через 3, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 минут отбирали аликвоту реакционной смеси и вносили в стакан, содержащий этанол. Стакан помещали на магнитную мешалку и титровали с помощью автоматического титратора раствором гидроксида натрия, до точки эквивалентности. Фиксировали объем щелочи, пошедший на титрование образца. Концентрацию образовавшихся жирных кислот вычисляли по формуле:

$$C = \frac{(Vn - V0) \cdot N \cdot 1000}{5}$$

С – концентрация образовавшихся жирных кислот, мкмоль/см^3;

V_n – объем щелочи, пошедший на титрование реакционной смеси в n минут, см^3;

V_0 – объем щелочи, пошедший на титрование контрольной пробы, см^3;

N – концентрация щелочи, рассчитанная с поправочным коэффициентом, М;

1000 – коэффициент перевода;

5 – титруемый объем реакционной смеси, см^3.

По рассчитанным значениям строили график зависимости концентрации образовавшихся жирных кислот от времени: на оси абсцисс откладывали время реакции в минутах, по оси ординат – концентрацию образовавшихся жирных кислот в мкмоль/см^3.

По виду получившегося графика определяли правильность подобранного разведения образца. При необходимости образец разводили.

Если график имел приемлемый вид, то строили соответствующий ему график в двойных обратных координатах. Получившаяся зависимость должна была иметь линейный вид и $R^2 \geq 0{,}95$.

Активность липазы в реакционной смеси рассчитывали по формуле:

$$U = \frac{1}{2 \cdot k}$$

U – активность липазы в реакционной смеси, мкмоль/(мин·см^3);

k – тангенс угла наклона графика, построенного в двойных обратных координатах, (мин·см^3)/мкмоль.

Ферментативную активность липазы в кормовой добавке рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \frac{U \cdot 50}{m}$$

А – активность липазы, мкмоль/(мин·г);

U – активность липазы в реакционной смеси, мкмоль/(мин·см^3);

50 – объем реакционной смеси, см^3;

m – масса навески кормовой добавки, г.

Результаты исследований и их обсуждение. Для разработки методики определения липазной активности в кормовых добавках в работе был применен титриметрический метод. Были изучены три варианта постановки анализа для определения концентрации образующихся после гидролиза жирных кислот. В первом случае после остановки ферментативной реакции образовавшиеся жирные кислоты титровали раствором щелочи. Во втором случае аликвоту раствора отбирали во время реакции через фиксированные промежутки времени и также проводили титрование щелочью свободных жирных кислот. В третьем случае проводили непрерывное титрование в процессе ферментативной реакции, подбирая скорость добавления щелочи, чтобы она совпадала со скоростью образования жирных кислот.

Первый вариант является наиболее быстрым и простым в исполнении, но в процессе эксперимента наблюдался сильный разброс полученных результатов, которые зависели от разведения фермента. Второй вариант по времени уступает первому варианту, но позволяет получить воспроизводимые данные, так как в результате эксперимента строится график зависимости концентрации

образующихся кислот от времени, по которому можно оценить правильно ли выбрано разведение фермента. Третий вариант более трудоемкий за счет выбора оптимальной скорости титрования, которое проводится на границе раздела фаз, и его эффективность зависит от перехода жирной кислоты в водную фазу, что тоже может приводить к нестабильным результатам. Таким образом, в дальнейшем при разработке методики применяли второй способ постановки анализа.

В качестве субстрата для определения липазной активности могут применяться трибутират, триолеат или масло с высоким содержанием триолеата. При гидролизе трибутирата образуется короткоцепочечная масляная кислота, которая титруется лучше, чем длинноцепочечная, что может влиять на полученное значение ферментативной активности (искажать его) [3]. Самым доступным из перечисленных субстратов является масло с высоким содержанием триолеата. В данной работе в качестве субстрата применяли оливковое масло.

Одним из этапов определения липазной активности является приготовление эмульсии выбранного субстрата. При выборе эмульгатора руководствуются следующими критериями: эмульсия должна получаться стабильной и мелкодисперсной, не расслаиваться во время анализа. В работе были рассмотрены три вида эмульгаторов: поливиниловый спирт (субстрат №1), гуммиарабик (субстрат №2) и тритон Х-100 (субстрат №3). Для эмульсии, приготовленной с использованием гуммиарабика, в процессе постановки реакции наблюдалось расслоение. Также в случае использования Тритон Х-100 и гуммиарабика наблюдалось неравномерное распределение масла по объему раствора. Наилучшие характеристики продемонстрировала эмульсия, приготовленная с использованием поливинилового спирта. Результаты, полученные при сравнении использования различных эмульгаторов, отображены на рисунках 1-3.

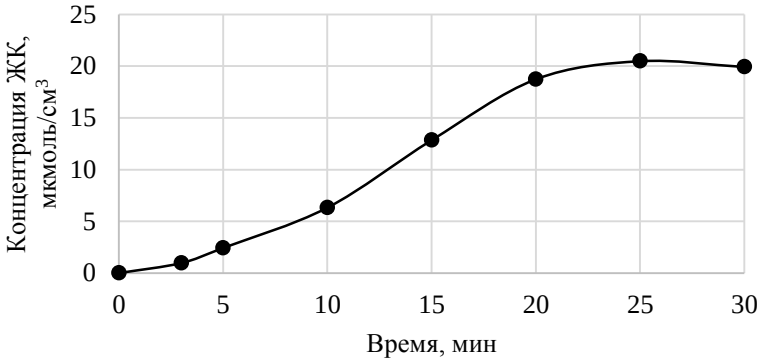

Рисунок 1 – Зависимость концентрации образующихся жирных кислот от времени при использовании субстрата №1

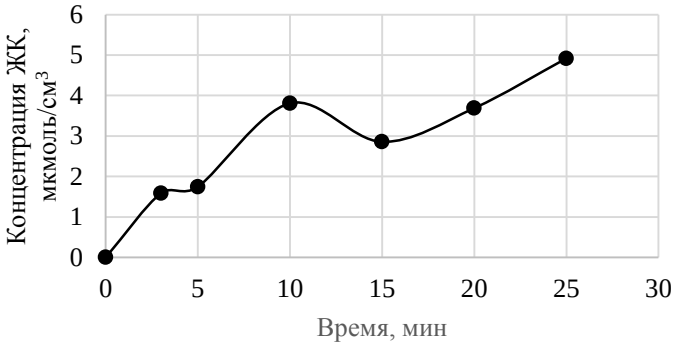

Рисунок 2 – Зависимость концентрации образующихся жирных кислот от времени при использовании субстрата №2

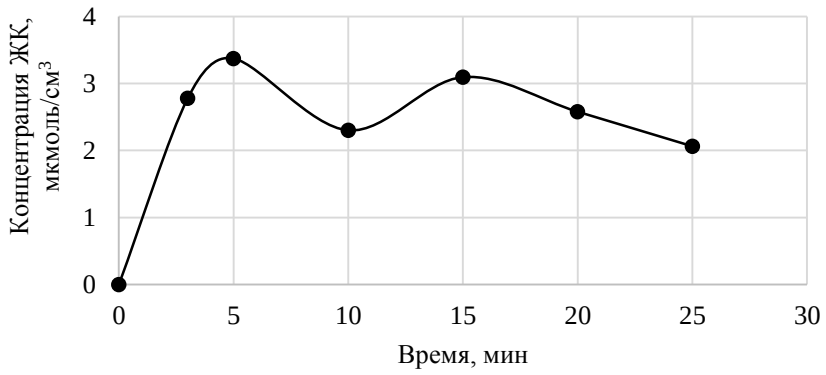

Рисунок 3 – Зависимость концентрации образующихся жирных кислот от времени при использовании субстрата №3

Титрование образующихся жирных кислот можно проводить как до точки эквивалентности, так и до фиксированного значения pH. Образующиеся жирные кислоты являются слабыми, соответственно, точка эквивалентности сдвинута в область щелочных значений pH. В данной работе провели сравнение двух вариантов титрования: до точки эквивалентности, определяемой прибором, и до значения pH равного 12. Полученные графики представлены на рисунке 4.

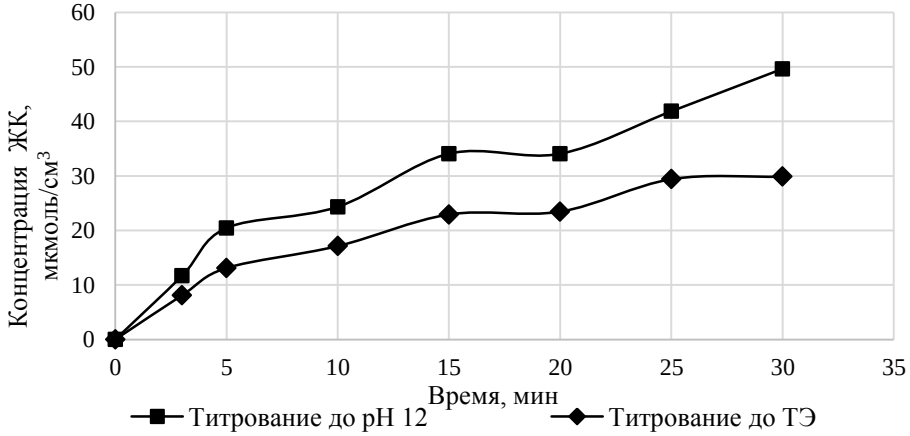

Рисунок 4 – Зависимость концентрации образующихся жирных кислот от времени при титровании до pH 12 и до точки эквивалентности

Использование автоматического титратора позволило точно определять не только объемы гидроксида натрия, пошедшего на титрование, но и значения точки эквивалентности. Следует отметить, что точка эквивалентности находится в диапазоне pH от 10,1 до 10,3, что позволяет расходовать меньший объем щелочи, чем при титровании до pH 12, что сказывается на рассчитанных концентрациях образующихся жирных кислот. Из представленных данных видно, что при титровании до точки эквивалентности через 15 минут после начала реакции образуются жирные кислоты в концентрации 23 мкмоль/см³, а через 30 минут – 30 мкмоль/см³, в то время как при титровании до pH 12 через 15 минут после начала реакции образуется 34 мкмоль/см³, а через 30 минут – 50 мкмоль/см³, что свидетельствует о завышенных значениях из-за большего расхода щелочи. Таким образом, показано, что необходимо использовать режим титрования до точки эквивалентности, а использование режима с фиксированным значением может приводить к завышению получаемых концентраций жирных кислот.

На основе выбранных условий для определения липазной активности было проведено определение ферментативной активности различных коммерческих препаратов,

содержащих липазу. Для каждого препарата были построены зависимости концентрации жирных кислот от времени. На рисунке 5 в качестве примера приведена зависимость концентрации образующихся жирных кислот от времени для липазы из *Mucor javanicus*, а также график в двойных обратных координатах (рисунок 6).

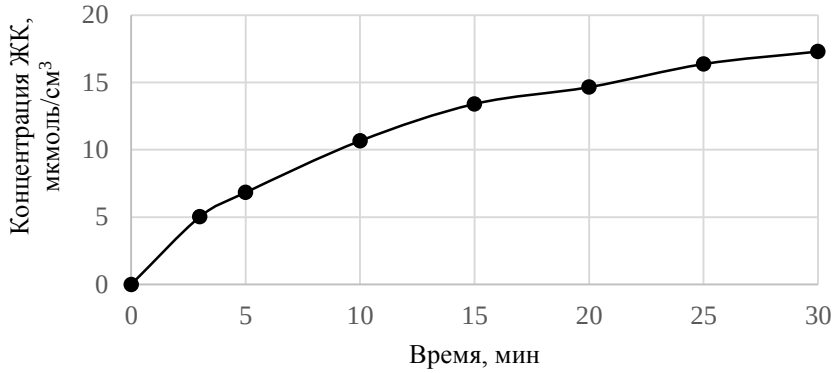

Рисунок 5 – Зависимость концентрации образующихся жирных кислот от времени для липазы из *Mucor javanicus*

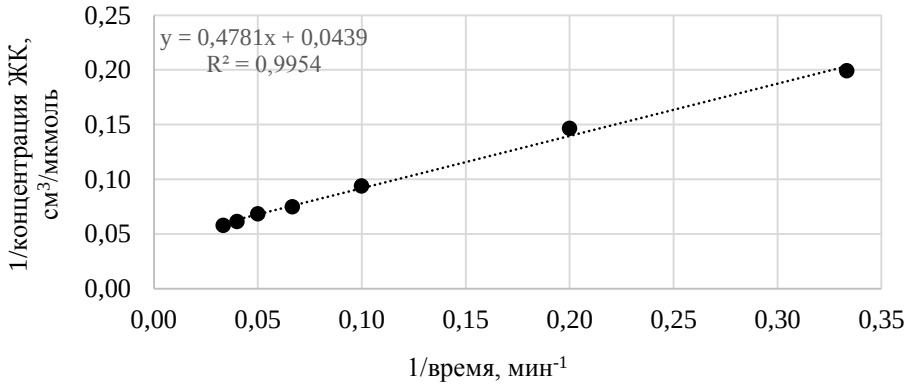

Рисунок 6 – Зависимость концентрации образующихся жирных кислот от времени для липазы из *Mucor javanicus* в двойных обратных координатах

Выводы. В результате была разработана методика определения липазной активности в кормовых добавках, подобраны оптимальные условия проведения ферментативной реакции и определения концентрации жирных кислот.

Проведена оценка активности липазы в зарегистрированных кормовых добавках с разным значением активностей по разработанной методике и показано, что полученные значения согласуются с заявленными показателями.

Список литературы

1. Кригер А. В. Выделение, очистка и изучение свойств рекомбинантной липазы, экспрессированной в Escherichia coli / А. В. Кригер, Л. С. Дышлюк, В. Ф. Долганюк [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. – Т. 12. – С. 122–126.

2. Никитенко А. И. Методические особенности определения активности липаз в семенах рапса / А. И. Никитенко, В. Н. Леонтьев, В. С. Болтовский // Труды БГТУ. № 4: Химия, технология органических веществ и биотехнология. – 2011. – № 4. – С. 190–193.

3. Серба Е. М. Усовершенствование методики определения липазы, основанной на методе получения жирных кислот, в ферментных препаратах для пищевой промышленности / Е. М. Серба, Е. Н. Соколова, М. Б. Оверченко [и др.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2023. – Т. 13. – № 1. – С. 56–66.

4. Beisson F. Methods for lipase detection and assay: a critical review / F. Beisson, A. Tiss, C. Ri-

vière [et al.] // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2000. – Vol. 102. – P. 133–153.

5. Cole S. W. The determination of reducing sugars by titration of ferricyanide / S. W. Cole // Biochemical Journal. – 1933. – Vol. 27. – No. 3. – P. 723–726.

6. Gupta P. Lipase catalyzed-transesterification of vegetable oils by lipolytic bacteria / P. Gupta, L.S.B. Upadhyay, R. Shrivastava // Research Journal of Microbiology. – 2011. – Vol. 6, No. 3. – P. 281–288.

7. Sharma R. Production, purification, characterization, and applications of lipases / R. Sharma, Y. Chisti, U.C. Banerjee // Biotechnology Advances. – 2001. – Vol. 19. – No. 8. – P. 627–662.

DOI: 10.48612/sbornik-2026-1-82
УДК 361.1:543.06

КИСЛОТНОЕ ЧИСЛО ЖИРА ЗЕРНОПРОДУКТОВ, ИДУЩИХ НА КОРМОВЫЕ ЦЕЛИ, КАК ИНДИКАТОР КАЧЕСТВА ХРАНЕНИЯ В АГРОБЕГАХ

Новикова Алла Владимировна, канд. с.-х. наук
Кочук Елена Валентиновна, канд. хим. наук
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир, Российская Федерация

Зерно сои и кукурузы имеет высокое содержание жира, что при неблагоприятных условиях хранения может привести к его прогорканию и дальнейшей порче товарной продукции. Ввиду того, что большие массы кукурузы и сои хранятся в агробегах в полевых условиях, то окисление жиров в процессе хранения может быть интенсивным, поэтому анализ кислотного числа жира может оценить качество хранения зерна и самой товарной продукции. Цель – провести анализ зерна сои и кукурузы по показателю кислотное число жира (КЧЖ) титриметрическим методом для определения доброкачественности кормового зерна после длительного хранения в агробегах. Результаты. Длительное хранение зерна с высоким содержанием жира в агробегах более 7 месяцев может провоцировать ухудшение показателей свежести на примере кислотного числа жира.

Ключевые слова: зерно; хранение; нестационарный способ хранения; агробег; кислотное число жира

ACID NUMBER OF FAT IN GRAIN PRODUCTS USED FOR FEED PURPOSES AS AN INDICATOR OF STORAGE QUALITY IN AGROBAGS

Novikova Alla Vladimirovna, PhD Agr. Sci.
Kochuk Elena Valentinovna, PhD Chem. Sci.
Federal Center for Animal Health, Vladimir, Russian Federation

Soybeans and corn grains have a high fat content, which, under unfavorable storage conditions, can lead to rancidity and spoilage of the commercial product. Since large quantities of corn and soybeans are stored in agricultural storage bins under field conditions, fat oxidation during storage can be intense. Therefore, analyzing the acid value of fat can assess the storage quality and the commercial product itself. The objective of this study was to analyze soybean and corn grains using the acid value of fat (FAV) titrimetrically to determine the quality of feed grain after long-term storage in agricultural storage bins. *Results.* Long-term storage of high-fat grain in agricultural storage facilities for more than 7 months can lead to a decrease in freshness indicators, as measured by the acid value of the fat.

Keywords: grain; storage; non-stationary storage method; agrobag; acid number of fat

Высокие урожаи зерна в России не обеспечены стационарными местами хранения, в связи с этим собранный урожай размещают в нестационарных условиях, например, в агро-