
ОБЩИЕ ПРОБЛЕМЫ, ОБЗОРЫ

УДК 636.4.5:636.085:577.15

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.4.5-39

**ПРОБЛЕМЫ МЕТОДОЛОГИИ КОНСТРУИРОВАНИЯ
ПОЛИФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ**¹Крюков В.С., ²Зиновьев С.В., ³Крюков О.В.¹ООО «Кормогран», Москва; ²ВНИИПП – филиал ФНЦ ВНИТИП, п. Ржавки Московской обл.; ³ООО «Кемин Индастриз», Москва, Российская Федерация

В последние годы прогресс в области микробиологии и генной инженерии создал предпосылки для создания широкого спектра ферментных препаратов (ФП) для использования в животноводстве. Перспективность этого направления несомненна, однако на пути к получению высокоактивных препаратов с заданными свойствами возникает ряд проблем методологического характера. Основная проблема заключается в том, что по результатам изучения экзогенных ферментов *in vitro* трудно спрогнозировать эффективность их действия в организме животного. Имеются доказательства, что это обусловлено недостаточностью имеющихся данных по составу, концентрации субстратов и их расположению в макромолекулярных комплексах кормов. Обоснованность этого предположения аргументируется в обзоре при рассмотрении особенностей действия различных ФП и их влияния на эффективность использования питательных веществ корма у моногастричных животных (свиньи, бройлеры). Основные разделы обзора: факторы, влияющие на действие карбогидраз; в кормлении животных; фитазы, протеазы, полиферментные препараты; влияние состава полиферментных препаратов на продуктивность. Экзогенные ферменты, потребляемые с кормом, вмешиваются в действие эволюционно сложившейся природной системы пищеварения и не подвержены биологической регуляции в желудочно-кишечном тракте. Под влиянием экзогенных ферментов изменяются секреция пищеварительных ферментов и микробиом кишечника, что оказывает влияние на иммунную систему. Механизмы взаимодействия экзогенных и эндогенных ферментов изучены недостаточно. По аналогии с составом природных ферментов предпринимаются попытки создания полиферментных смесей экзогенных ферментов, однако прогнозировать их действие в организме животных ещё сложнее по сравнению с моноферментными препаратами. Неустойчивость результатов использования ФП в кормлении животных в основном обусловлена уровнем знаний у разработчиков и потребителей, недостаточным для адекватного подбора ферментов с учётом изменчивости субстратного состава кормов. Поэтому принимать решение о применении ферментных препаратов целесообразно после проведения их испытаний на фоне реального состава комбикормов.

Ключевые слова: корма, кормовые ферменты, карбогидразы, протеаза, фитаза, птица, свиньи

Проблемы биологии продуктивных животных. 2021. 4: 5-39

Введение

Первая работа по применению кормового фермента была опубликована в 1925 году (Clicker, Follwell, 1925). Вначале научное направление по изучению использования ферментов в кормлении животных развивалось медленно (Hastings, 1946; Fry et al., 1957). Развитие интереса к применению ферментов в кормлении животных долго сдерживалось их высокой стоимостью, в последующем были найдены активные продуценты ферментов и усовершенствована технология их получения, что сделало ферменты доступными для практики. В последнее десятилетие созданы высокоактивные ферментные препараты с заданными свойствами и гарантированным качеством. Они детально изучены в лабораторных условиях, их эффективность подтверждена в ходе производственных испытаний, однако в практических условиях любые ферментные препараты не

всегда обеспечивают планируемую отдачу. Потребители, сталкиваясь с отсутствием ожидаемых результатов, делают вывод о том, что использованный ферментный препарат не эффективен, но такое заключение справедливо только для конкретной ситуации, потому что кормовые ферменты ведущих производителей хорошо изучены и их действие доказано. При отсутствии положительного результата разработчики препарата должны провести детальный анализ, установить причины отсутствия ожидаемого улучшения продуктивности или экономии кормов и вносить изменения в рекомендации по применению ферментов. Практики, оценивают ферментные препараты не по механизмам действия и другим заявленным свойствам, а по прибыльности их использования в кормлении животных. Если препарат в ряде случаев работает, а в других не эффективен, то нельзя «винить» фермент, просто ему «не дали работы» или не создали условий для его действия. Часть исследований проводят без достаточного научного обоснования, что ведёт только к пополнению статистики негативных зоотехнических результатов.

Исследования, оценивающие использование экзогенных ферментов, добавляемых в рационы животных, не новы. В этом направлении рядом ведущих специалистов опубликовано множество оригинальных работ и обзорных статей (<https://www.semanticscholar.org/>). Выделить наиболее важные работы или научные направления не представляется возможным, в связи с тем, что их значимость определялась постановкой конкретных задач и научных интересов исследователей. Считают, что коммерческое применение ферментов приобрело экономическое значение с началом использования фитазы (Cowieson, Ravindran, 2007), хотя, возможно, это не совсем верно. Классифицируют препараты по специфической активности (табл. 1). С началом применения ферментов начал изменяться состав рационов на основе использования данных по доступности питательных веществ и энергии (Vieira et al., 2014).

Таблица 1. Основные коммерческие ферментные препараты и их субстраты

Ферменты	Целевой субстрат	Корма, содержащие субстраты
Ксиланазы, ЕС 3.2.18	Ксиланы (Гемицеллюлоза)	Пшеница, тритикале, рожь, ячмень.
β -Глюканы, ЕС 3.2.1.4; ЕС 3.2.1.6; ЕС 3.2.1.39; ЕС 2.1.73	Целлюлоза (β -глюканы)	Ячмень, рожь, овёс
α -Галактозидаза, ЕС 3.2.1.22	Сахариды с α -d- галактозильными группами	Зерно злаков, соевый шрот
Амилаза, ЕС 3.2.1.1	Крахмал	Зерно злаковых и бобовых культур
Маннаназы, ЕС 3.2.1.25; ЕС 3.2.1.78	Стенки клеток (компоненты клетчатки)	Растительное сырьё
Пектиназы, ЕС 3.1.1.11; ЕС 3.2.1. 15; ЕС 4.2.2.10	Пектины	Зерно бобовых
Протеазы, ЕС 3.4.21.62	Протеин, протеиды	Растительное сырьё
Фитазы, ЕС 3.1.3.8; ЕС 3.1.3.26	Фитиновая кислота	Растительное сырьё

Факторы, влияющие на эффективность действия карбогидраз

Главными критериями при выборе ферментных препаратов является их специфичность и активность. При разработке и оценке новых препаратов их тестируют на чистых (модельных) субстратах с чётко охарактеризованными свойствами, которые без ограничения со стороны других веществ доступны для контакта с ферментами и проявления их действия. На этом принципе основаны методы и стандарты определения активности ферментов, контроль их качества (ГОСТ Р 53047-2008; ГОСТ Р 53046-2008; ГОСТ Р 53360-2009; ГОСТ Р ИСО 30024-2012; ГОСТ 31488-2012; ГОСТ 31662-2012; ГОСТ 34430-2018; Крюков и др. 2019). Активность ферментов и их действие могут иметь разное истолкование. Величины активности, указываемые на упаковке, необходимы для идентификации продукта, при этом контроль активности препаратов должен проводиться по методам, рекомендованным поставщиком, он применяется только для контроля качества приобретаемой продукции, и не может использоваться в качестве критерия для выбора ферментного препарата. Установлено, что не всегда препараты с более высокой активностью обеспечивает лучший зоотехнический результат (Ravindran, 2013). Активность фермента отражает возможность

заявленного действия в определённых условиях, поэтому активность, установленная при анализе рекомендуемым методом, не совпадает с действием, проявляемым в ЖКТ (Vasquez, Glitsoe, 2012). Действие ферментов характеризуют количеством образовавшихся продуктов реакции или убылью исходного субстрата, которые зависят от условий измерения, включая pH среды, её состав, температуру, используемый субстрат, время инкубации, интенсивность перемешивания среды и другие параметры. Условия измерений *in vitro* не совпадают с таковыми *in vivo*, поскольку pH, состав среды и концентрация доступного субстрата изменяются на протяжении ЖКТ, и к ним следует добавить действие протеаз ЖКТ, которые могут расщеплять экзогенные ферменты (Волчок и др., 2018). Величины активности кормовых ферментов, приводимые в научных публикациях, следует рассматривать как установленные в конкретных условиях, и они не обязательно повторяются при изменении этих условий.

Рецептура комбикормов включает различные виды сырья, соотношение которых меняется в зависимости от стоимости, наличия и возраста животных, поэтому содержание субстратов в рационах изменчиво. Вариабельность содержания субстратов в комбикормах является главной причиной вариабельности результатов при использовании ферментов (Cowieson, 2010; Vieira et al., 2014; Torres-Pitarch et al., 2019). Наибольшее внимание уделяют полисахаридам, которые участвуют в построении стенок клеток растений. Из них до 90% приходится на целлюлозу, гемицеллюлозу и пектин (McNeill et al., 1984). В связи с этим в животноводстве получили распространение целлюлазы, ксиланазы и, в зависимости от субстратного состава корма, могут применяться другие карбогидразы. Последние годы широкое применение получили фитазы, хотя концентрация фитатов в сырье ниже по сравнению с некрахмальными полисахаридами (НПС), но в практических условиях они более устойчиво повышают продуктивность по сравнению с другими кормовыми ферментами.

Учитывая изменчивость рецептов комбикормов и содержания в них субстратов, в состав комбикормов включают одновременно несколько ферментов. При этом одни ферменты добавляются в корма обоснованно, а другие иногда «про запас». Моноферменты используют всё реже. Для обеспечения ожидаемой эффективности ферменты должны сохранять активность в тех отделах ЖКТ, в которых содержится достаточное количество субстратов. Поэтому разработчикам рецептов комбикормов для принятия решения о применении ферментов необходимо обладать знаниями о субстратах корма, типе фермента, включаемого в конкретный рецепт, и особенностях физиологии пищеварения, чтобы достичь максимальной эффективности. В связи с невозможностью обоснованно оценить свойства сырья на основании содержания в нём субстратов, в практических условиях результаты действия ферментов прогнозируют, основываясь на заинтересованной информации поставщиков, личных ожиданиях, или на основании собственного опыта. Последний подход является наиболее надёжным.

Целлюлазы. Субстратом целлюлаз является целлюлоза – это один из простейших по составу и строению полисахаридов, который состоит из однородной цепи D-глюкопираноз, соединённых β -1,4 связями. За счёт водородных связей могут конденсироваться до 250 цепей, образуя кристаллические микрофибриллы (Kolpak, Blackwell, 1976). В некоторых участках микрофибрилл кристаллическая структура нарушается, переходя в аморфную. Соотношение кристаллической и аморфной части зависит от происхождения сырья (Lin et al., 1987). Микрофибриллы образуют матрикс, состоящий из полисахаридов других типов, в основном гемицеллюлоз, которые создают препятствия целлюлазам для взаимодействия с целлюлозой.

В расщеплении целлюлозы участвуют четыре класса ферментов. Эндоглюканызы (ЕС 3.2.1.4) гидролизуют целлюлозу до глюкоолигосахаридов; целлюбиогидролазы (ЕС 3.2.1.91) высвобождают целлюбиозу из кристаллической целлюлозы; β -глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21) разлагают олигосахариды до глюкозы; экзоглюканызы высвобождают глюкозу на концевых участках молекул целлюлозы и глюкоолигосахаридов. Все классы ферментов продуцируются аспергиллами, при этом количество изоферментов у разных видов и даже у штаммов одного вида, может различаться (De Vries, Visser, 2001). На этом основании следует ожидать, что в зависимости от происхождения целлюлазы её действие на субстрат будет различаться. Кроме того, доступность самих субстратов будет изменяться в зависимости от окружения их другими полисахаридами и лигнином, что тоже

влияет на эффективность действия целлюлаз. Именно эти факторы создают вариабельность результатов при использовании целлюлаз в кормлении животных.

Среди коммерческих препаратов распространены эндоцеллюлазы, действие которых приводит к образованию крупных олигосахаридов, которые в дальнейшем могут подвергаться гидролизу β -глюкозидазой (ЕС 3.2.1.21) до тетрамеров остатков глюкозы, целлобиозы или отдельных молекул глюкозы. Установлено, что при добавлении в рацион целлюлозы изменяется состав микробиоты ЖКТ птицы, что также может оказывать влияние на продуктивность (De Maesschalck et al., 2019).

На целлюлозу похожи β -глюканы, потому что состоят преимущественно из линейных цепей глюкозы, однако присутствующие в них β -1-3 связи нарушают однородную структуру цепей, что приводит к их менее плотной упаковке в составе микрофибрил (Burton, Fincher, 2009). В основной цепи β -глюкана могут присутствовать и другие моносахара. В результате β -глюканы приобретают растворимость, которая зависит от их размера. В свою очередь, растворимость и размер полимолекулярных частей влияют на вязкость кишечного содержимого, от которой зависит переваривание и всасывание питательных веществ.

В природе грибы и бактерии продуцируют целлюлазу, чтобы обеспечить себя энергией, поэтому эволюционно преимущество приобрели те виды, у которых этот процесс протекает более эффективно. На примере *Clostridium cellulovorans* установлено существование полиферментного комплекса, называемого целлюлосомой, который разлагает целлюлозу в клеточной стенке растений. *C. cellulovorans* выделяют в среду везикулы, к которым прикреплены целлюлосомы. Они обеспечивают связь фермента с нерастворимыми субстратами и разлагают их до растворимых продуктов. Целлюлосомные комплексы представляют собой полиферментные образования, включающие множество функциональных доменов, которые взаимодействуют друг с другом и с целлюлозным субстратом. Одна из субъединиц - гликопротеин "скаффолдин", входит в особый класс некаталитических полипептидов - скаффолдинов. Субъединица скаффолдина избирательно интегрирует целлюлазы и субъединицы ксиланазы в когезионный комплекс. Интактные везикулы сохраняли целлюлолитическую активность *in vitro*, однако обработка их ультразвуком вела к снижению скорости разложения микрокристаллической целлюлозы; при этом не изменялся гидролиз растворимой карбоксиметилцеллюлозы (Ichikawa et al., 2019). Углеводный состав клеточных стенок многообразен, и отдельные молекулы углеводов вступают в различные взаимосвязи между собой и другими веществами. Это приводит к образованию структур с неповторимым строением, создающим препятствия для целлюлазы и других ферментов в обеспечении доступности к целевому субстрату. Соотношение отдельных ферментов в целлюлосомах изменяются в зависимости от состава и молекулярной структуры субстрата. Изменения направлены на обеспечение синергизма между отдельными ферментами и максимального использования субстрата (Yamamoto, Tamaru, 2016). Это подтверждено при изучении ферментов, входящих в целлюлосомы, которые содержали не только целлюлазы, но и гликозидгидролазы, способные разрушать гемицеллюлозу (Blouzardet et al., 2007).

Действие ферментов, входящих в состав целлюлосом, специфично; так, в эксперименте они разрушали ксиланы стенок клеток кукурузы, но не действовали на очищенный ксилан или кристаллическую целлюлозу (Murashima et al., 2003; Wood, McCrae, 1979). На основании вышеизложенного можно заключить, что при росте грибов в их целлюлосомах формируется интегрированный набор ферментов, обеспечивающих расщепление полисахаридов, препятствующих доступности целлюлазы к субстрату. В корма животных добавляют очищенные ферменты с целевой активностью, которые действуют намного слабее, чем в составе целлюлосом, так как теряется синергизм с другими ферментами в силу их отсутствия. Не изучены структурные связи между ферментами в целлюлосомах, обеспечивающие их высокую активность и разнообразие субстратной специфичности (Fontes et al., 2010). Это создает неопределённости при прогнозировании результатов использования целлюлаз в составе кормов. Часто негативные результаты бывают обусловлены неудачно выбранным методом для измерения параметров пищеварения. Под перевариванием питательных веществ понимают их расщепление до состояния, которое позволяет всасываться образующимся веществам. Эндоферменты расщепляют молекулы

полимеров на несколько крупных частей, т.е. расщепление исходного вещества на несколько частей является перевариванием и регистрируется как таковое, однако образующиеся олигомеры не способны всасываться в кишечнике, и они не будут способствовать повышению продуктивности (в данном случае не обсуждается биологическая активность образующихся олигомеров, хотя она важна). Не учитывая эти особенности на методическом уровне, исследователи приходят к правильному по смыслу заключению о повышении переваримости питательных веществ под влиянием кормовых ферментов, которое, однако, не сопровождается повышением эффективности использования питательных веществ и ростом продуктивности (Torres et al., 2019).

В опыте цыплятам с 3-х до 8-недельного возраста скармливали корм, содержащий 20% пшеничных отрубей, к которому была добавлена целлюлаза. В конце опыта живая масса цыплят, получавших корм с отрубями, была ниже; добавка в корм целлюлазы не повлияла на рост, хотя немного снизила потребление корма и повысила эффективность его использования на прирост живой массы. Под влиянием целлюлазы у 8-недельных цыплят повысилась переваримость суммы сухих веществ с 73,2 до 75,3%, том числе целлюлозы с 15,9 до 28,0%, кислотно-детергентной клетчатки с 25,1 до 32,5% и гемицеллюлозы с 38,1 до 44,0%. Под действием целлюлазы высвобождались минералы, связанные с нейтрально-детергентной клетчаткой, особенно кальций и медь. По мнению авторов, повышение доступности минералов было связано с разрушением клеточных стенок (Nahm, Carlson, 1985). Из этого следует, что косвенное влияние ферментов на продуктивность может быть шире ожидаемого исходя из их специфической активности. В другом эксперименте на бройлерах при включении целлюлазы в дозе 1000 ед./кг в корм, содержащий 21% сырого протеина, не выявили изменений по скорости роста и содержанию абдоминального жира (Yamazaki et al., 2007). Изучение активности β -глюканазы в 10 коммерческих ферментных препаратах при pH 2,5–6,5, показало, что наибольшая активность у свиней проявлялась при pH 4,5–5,5, и она резко снижалась при pH 6,5, т.е. в среде, характерной для тонкой кишки. Инкубация ферментов при pH 2,5–3,5 в течение 15–120 минут снижала активность β -глюканазы, но при последующем увеличении pH до 5,5 она восстанавливалась до 26–56% от исходной. Из 10 ферментов, изученных *in vitro*, 5 включали в рационы на основе шелушённого ячменя. Результаты эксперимента выявили отчётливую тенденцию к увеличению ОЭ и переваривания протеина, но только один из испытанных препаратов повысил прирост живой массы по сравнению с контролем. Авторы пришли к заключению, что угнетение активности β -глюканазы в кислой среде желудка у свиней не является единственной причиной её слабого действия (Baas, Thacker, 1996).

Степень переваривания полисахаридов, определяемая в экспериментах, зависит от метода её измерения и от генотипа животных. На переваримость клетчатки и других питательных веществ в подвздошной кишке не влиял генотип, но общая переваримость, установленная по разнице (корм) – (кал), была выше у свиней местных пород по сравнению с помесью ландрас \times йоркшир. Включение в рацион смеси ферментов с преобладанием целлюлазы повышало живую массу и эффективность использования корма на рационе с высоким содержанием клетчатки, и эффект отсутствовал при потреблении кормов с низким содержанием клетчатки. Помеси ландрас \times йоркшир лучше реагировали на добавку ферментов по сравнению с местными свиньями (Len et al., 2009). Из этого следует, что проявление действия целлюлаз зависит не только от свойств фермента, но и от уровня клетчатки в корме, общей питательности комбикорма, от генетических особенностей животных и от методики изучения переваримости целевого субстрата. В дальнейшем будет показано, что этот вывод распространяется и на оценку результатов действия других ферментов.

Выше было уделено внимание расщеплению целлюлозы и влиянию образующихся продуктов на продуктивность животных, однако в последние годы появляется информация о том, что потребление клетчатки влияет на экспрессию белков теплового шока, на целостность барьера слизистой оболочки, кроме того, продукты её расщепления могут оказывать пребиотическое действие, изменяя состав кишечной микрофлоры (Lindberg, 2014). Положительное действие обусловлено не целлюлазой, а образующимися в результате её действия олигосахаридами, что подтверждено действием олигосахаридов, включаемых в рацион, не содержащий фермента (Madhukumar, Muralikrishna, 2011; Baker et al., 2021).

Влияние ксиланаз на продуктивность

Гемицеллюлоза включает широкий перечень гетерогенных полисахаридов и является второй по распространённости в стенке клеток растений (Collins et al., 2005). Основной полимер гемицеллюлозы в зерновых - ксилан (ксилоглюкан), состоит из цепи молекул D-ксилозы, соединённых β -1,4-связями. К остаткам ксилозы часто присоединяются различные боковые группы, включающие L-арабинозил, D-галактозил, ацетил, ферулоил, *p*-кумароил и остатки глюкуроновой кислоты (Wilkie, Woo 1977). Ксиланы кормов существенно различаются по структуре в зависимости от их происхождения (Ebringerová and Heinze, 2000), при этом злаки содержат большое количество L-арабинозы и, поэтому их называют арабиноксиланами (АКс).

Ксиланаза (глюкозидгидролаза), действует на β -1,4-гликозидные связи АКс, приводя к образованию смеси полисахаридов с меньшей молекулярной массой, олигосахаридов и пентоз. Не все продукты переваривания НПС полезны для животных, так как они не способны всасываться и не вносят вклад в энергетическую обеспеченность организма. Ксилоза, образующаяся при переваривании ксиланов, даже может негативно действовать на продуктивность. При скармливании свиньям d-ксилозы, до 44,5 - 52,6% её выделялось с мочой, при этом снижалась переваримость органического вещества, энергии и протеина (Schutte, 1991). На этом основании можно предполагать, что повышение продуктивности животных при использовании ксиланаз обусловлено не гидролизом ксиланов до моноксилозы: оно опосредовано образованием ксилоолигосахаридов (КОС), которые проявляют пребиотическое действие, являясь источником энергии для микрофлоры кишечника, т.е. влияют на микробиом кишечника (Petru et al., 2021; Baker et al., 2021). В исследованиях *in vitro* показано, что штаммы *Bifidobacteria*, *Lactbacilli* и *Pediococci spp.* активно использовали КОС из отрубей пшеницы (Madhukumar, Muralikrishna, 2011). В опыте на свиньях установили, что включение в рацион КОС в дозе 100 г/т привело к увеличению доли лактобацилл в составе микробиома кишечника (Pan et al., 2019). В другом исследовании добавка КОС показала преимущество перед виргиниамицином и колистином, значительно повысив долю *Coprococcus*, *Lactobacillus*, *Roseburia* и *Ruminococcus*, которые считают полезными (Azad et al., 2018). Добавление к корму поросят-отъёмышей КОС в количестве 200 г/т повысило на 17% прирост живой массы и на 14% эффективность использования корма (Liu et al., 2018).

Экзогенные ферменты влияют на прирост массы кишечника и его микроструктуру, на секрецию пищеварительных соков и всасывание, что может сопровождаться положительным или отрицательным влиянием на продуктивность (Cowieson, 2005; Yuan et al., 2017).

В эксперименте на цыплятах-бройлерах в рацион с преобладанием пшеницы добавляли ксиланазу в дозе 0, 3750 и 5625 XU/кг. В результате снижалась вязкость содержимого подвздошной кишки, численность колоний кишечной палочки в слепых кишках и концентрация аммиака в помёте, одновременно возрастало количество лактобацилл в подвздошной и слепой кишках. С ростом дозы фермента линейно улучшался прирост живой массы и эффективность использования корма (Liu et al., 2017). Ранее на цыплятах-бройлерах испытывали действие однокомпонентной термостабильной эндо-1,4- β -ксиланазы, полученной в результате культивирования *Thermomyces lanuginosus*, дозах 0, 100, 150, 200, 400 and 4000 FXU/кг. Доза 400 FXU/кг существенно снижала вязкость химуса, повышала переваримость сухого вещества, протеина и жира, что привело к увеличению содержания ОЭ в корме и продуктивности. Величина изучаемых показателей зависела от сорта пшеницы, входящей в состав рациона (Francesch et al., 2012).

Действие ксиланаз продемонстрировано в эксперименте на цыплятах-бройлерах при испытании трёх препаратов ксиланаз на фоне комбикорма, включавшего пшеницу (78,4%), казеин (14,9%) и премикс. Установили, что ксиланазы, продуцируемые разными микроорганизмами, проявляли неодинаковое действие на арабиноксиланы в зависимости от их растворимости. Определяя отдельные фракции НПС, пришли к выводу, что образцы пшеницы с нормальным и пониженным уровнем обменной энергии различаются не только по концентрации общих и вязких НПС, но и по структуре клеточных стенок. Пшеница с пониженным содержанием ОЭ более подвержена действию ксиланаз, влияющих на нерастворимые НПС, с сопутствующим увеличением вязкости химуса. В результате пришли к выводу о различном влиянии испытанных ксиланаз на продуктивные показатели птицы и указали на необходимость более детального анализа

структурных особенностей НПС (Choct et al., 2004). Прогнозировать эффективность применения ксиланаз в кормлении животных трудно, что обусловлено разнообразным строением ксиланов, а также их связями с другими веществами, входящими в состав сырья. Ксилоза формирует главную цепь полимера, в которой до 85% остатков ксилозы связаны с различными углеводами и их метаболитами, образующими боковые цепи (Chanliaud et al., 1995). Выделяют 4 основных группы ксиланов: арабиноксиланы, глюкуроноксиланы, глюкуроноарабиноксиланы и галактоглюкуроноарабиноксиланы. На основании химического строения ксиланы классифицируют на следующие типы:

1. Содержащие в боковых цепях в качестве единственного концевой звена -L-арабинофуранозильный заместитель;
2. Заместителем является только α -D-глюкуроновая кислота или ее производное 4-O-метилового эфира;
3. В качестве заместителя присутствуют α -D-глюкуроновая (и 4-O-метил- α -D-глюкуроновая) кислота и -L-арабиноза;
4. Концевые цепи олигосахаридов имеют β -D-галактопиранозильные остатки (Choct, 2017).

Расщепление разнообразных ксиланов происходит под действием соответствующих ксиланаз, которые распределяются по множеству семейств (Ebringerová, Heinze, 2000). На сайте CAZY (https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Families) зарегистрировано 168 семейств гликозидгидролаз (GH). Грибковые и бактериальные коммерческие ксиланазы представлены в основном GH из 10-го и 11-го семейств (β -1,4-эндоксиланаза; ЕС 3.2.1.8). Большая часть ксиланаз GH 11 атакуют только остов ксилана в непрерывных последовательностях, тогда как ксиланазы GH 10 более универсальны и могут дополнительно расщеплять связи, прилегающие к боковым цепям (Biely et al., 1997). Считают, что ксиланазы GH 11 имеют меньший размер молекул, поэтому легче проникают в клеточную стенку и эффективнее разлагают нерастворимый ксилан по сравнению с ксиланазы GH 10 (Paës et al., 2012).

От строения боковых цепей ксилана зависят реакционная способность молекулы, возможность её связывания с целлюлозой и различными гемицеллюлозами, что влияет на способность к расщеплению под действием ферментов. Арабиноксиланы (АКс) представлены сложными трёхмерными структурами, которые связаны с другими компонентами клеточной стенки растений (Jeremic et al., 2014). Степень разветвления основной цепи АКс у зерновых различается; пшеница и ячмень имеют более высокую степень полимеризации и молекулярную массу, по сравнению с кукурузой. Пшеница содержит большее количество высокомолекулярных арабиноксиланов (7,3% от сухого вещества) и выражено проявляет антипитательные свойства (Knudsen, 2014), в то время как ячмень содержит большое количество β -глюканов с высоким отношением связей β -(1-3) к связям β -(1-4). Скармливание этих двух видов зерна повышает вязкость химуса, приводя к снижению переваримости и доступности питательных веществ. Клеточные стенки кукурузы состоят в основном из нерастворимых АКс, присутствие которых в корме не вызывает повышения вязкости кишечного содержимого. Отношение арабинозы к ксилозе (А/Кс) используют в качестве индикатора растворимости АКс; высокое значение А/Кс указывает на повышенное присутствие в структуре арабинозы и меньшую растворимость. Например, в АКс пшеницы и ржи, у которых соотношение А/Кс составляет 0,57- 0,7, наблюдается повышенная растворимость и вязкость по сравнению с АКс кукурузы с соотношением 0,81 (Lærke et al., 2015; Buksa et al., 2016). Снижение растворимости АКс вызывает ограничение их доступности к действию ферментов. Хотя имеются примеры, указывающие на возможность ферментации нерастворимых НПС (Gutierrez et al., 2013; Choct et al., 2004). Эндоксиланазы подвергают гидролизу β -1,4-гликозидные связи в разных по строению АКс, что приводит к образованию широкого спектра конечных продуктов, среди которых доля мономеров ограничена. Для полного гидролиза АКс кукурузы до мономеров основной цепи и отщепления боковых цепей необходимы α -арабинофуранозидазы, α -арабинофураногидролазы, α -глюкуронидазы, α -галактуронидазы и ацетилксиланэстеразы, β -d-ксилозидазы, эстеразы феруловой и *p*-кумаровой кислоты - всего 9 ферментов (Stein, 2019). Полное расщепление АКс *in vivo* маловероятно и не обеспечит окупаемости затрат на такой внушительный перечень ферментов (Bedford, 2009). Полный состав продуктов,

высвобождаемых из кормов в ЖКТ под влиянием ксиланазы, неизвестен (Petry, Patience, 2020), что создаёт трудности для изучения механизма действия ксиланазы и разработки эффективных методов её применения.

Скармливание бройлерам комбикормов, приготовленных по одному и тому же рецепту, с одинаковой питательностью, но отличавшихся тем, что в них были включены 6 сортов кукурузы показало, что живая масса существенно зависела от сорта. Три источника кукурузы повышали живую массу, а два – снижали, несмотря на то, что содержание клетчатки в испытанных образцах было практически одинаковым. На этом фоне добавка к кормам ксиланазы повышала живую массу (Williams et al., 2018). Аналогичное изучение действия ксиланазы на пшеницу, выращенную в шести разных регионах, показало, что ксиланаза во всех случаях повышала переваримость аминокислот, использование валовой энергии, хотя величина изучаемых параметров зависела от происхождения пшеницы (Lu et al., 2020). При сравнении действия ксиланазы на цыплят, получавших два сорта мягкой или два сорта твердой пшеницы, установили повышение уровня обменной энергии в корме, хотя ксиланазы не оказали влияния на продуктивные показатели. Отсутствие ускорения скорости роста под действием ксиланазы объяснили тем, что питательность рационов была более высокой, по сравнению с той величиной, которая обычно ограничивает проявление действия ферментов (Olukosi and Bedford, 2019).

Положительное действие ферментов, расщепляющих НПС, часто объясняют снижением вязкости содержимого кишечника у птиц (Choct, 2006). Однако этот довод не позволяет объяснить улучшение роста бройлеров под действием ксиланазы, которую включали в рационы с преобладанием кукурузы, не повышающей вязкости кишечного содержимого. Предположили, что положительное действие карбогидраз связано с нарушением целостности клеточных стенок растений, которое способствует повышению доступности эндогенных ферментов к содержащимся внутри клеток крахмалам и белкам, что обеспечивает их более полное переваривание (Cowieson and Ravindran, 2008). Это предположение согласуется с данными о взаимодействии карбогидраз с другими ферментами, и его широко используют для объяснения эффектов положительного действия. При изучении влияния ксиланазы на переваримость крахмала сравнительно недавно установили, что материал клеточных стенок растений в химусе тонкого кишечника структурно не изменялся, хотя переваримость крахмала повысилась. Авторы заметили, что ксиланаза каким-то образом повышает выделение нейропептида *PYY*, под действием которого увеличивается время нахождения химуса в кишечнике, повышая переваривание протеиновой оболочки крахмальных гранул, что облегчает действие эндогенной амилазы (Lee et al., 2017). Не исключено совместное действие этих двух механизмов. Из этого следует, что при регистрации конечного эффекта, прямо не связанного со специфичностью фермента, остаются скрытыми другие стороны его действия.

Ксиланазу продуцируют многие микроорганизмы. Распространённые коммерческие продукты могут быть образованы бактериями или грибами (Bhardwaj et al., 2019), которые по-разному влияют на продуктивность. Изучение действия монокомпонентных эндо-1,4-ксиланаз, которые в эксперименте обозначили как А, В, С, D и Е, показало, что поросята, получавшие с 42 по 96 день жизни рационы с пшеницей и ксиланазами А и С или рационы с кукурузой и ксиланазами А и D, имели более высокий среднесуточный прирост живой массы, по сравнению с получавшими корма без ксиланаз, или рационы с пшеницей и ксиланазой D и с кукурузой и ксиланазами В и С. Наилучшее использование корма на прирост обеспечила ксиланаза А. Лабораторные исследования показали, что переваримость суммы АКс и НПС в целом в комбикормах с пшеницей повышалась под влиянием ксиланазы С и в рационе с кукурузой – под влиянием ксиланаз В и Е. На фоне обоих рационов испытанные ксиланазы не изменили переваривание сухого вещества корма, общей энергии и протеина. Авторы исследования сделали вывод, что испытанные ксиланазы по-разному влияли на переваримость питательных веществ и продуктивность животных. Отмеченные различия могли быть связаны с тем, что ксиланазы включали в корма в одинаковой дозе по массе, без учёта их активности и оптимальных доз, поэтому другие дозы ферментов в зависимости от условий могут показать иную эффективность (Ndou et al., 2015). Результаты этого исследования показывают, что ксиланазы в зависимости от происхождения отличаются по действию, как на фоне одного субстрата, так и в зависимости от состава рациона, поэтому сравнивать эффективность ксиланазы и других

ферментов, установленную в разных условиях, не имеет смысла. Эта констатация особенно важна при прогнозировании ожидаемого действия ксиланаз в практических условиях. Также показано, что улучшение переваримости питательных веществ не всегда сопровождается повышением продуктивности и снижением расхода корма на прирост живой массы. Для выяснения причин различной эффективности ксиланаз необходимо определять специфику субстратов и образующихся продуктов переваривания. Изучая изменение состава продуктов гидролиза НПС в разных отделах кишечника под влиянием трёх разных ксиланаз, установили, что они, расщепляя одну и ту же гликозидную связь в АКс, различаются по механизму действия на растворимую и нерастворимую фракции НПС. Одни ксиланазы, гидролизуя АКс в нерастворимых НПС, ведут к увеличению растворимых НПС, причём масса образовавшихся частей может быть разной; это могут быть ксиланазы, образующие фрагменты более 500000 Да, которые создают вязкие растворы. Другие ксиланазы ведут к высвобождению более мелких фрагментов и, даже мономеров, которые не влияют на вязкость и могут всасываться (Choct et al., 2004). В публикуемых работах в большинстве случаев не описаны свойства субстратов, что создаёт неопределённость в правильности оценки выбранных ферментов.

Из вышеизложенного следует, что ксиланазы представлены рядом ферментов, действие которых отличается по составу образуемых конечных продуктов, что обуславливает значительный разброс результатов при изучении действия ксиланаз на продуктивность животных. Это заключение в отношении ксиланаз не является уникальным, и оно относится к другим кормовым ферментам, поскольку обоснование их выбора также ограничено слабой изученностью доступности субстратов и особенностей действия применяемых ферментов. В связи с этим точный ответ по их действию на животных в конкретных условиях неизвестен, получаемые результаты не всегда находят объяснения, потому что прогнозирование не имеет надёжной научной основы (Bedford, 2018). Опубликованные обзоры литературы часто пополняют или систематизируют набор эмпирических знаний и показывают, что кормовые ферменты в большинстве случаев вызывают положительную реакцию, при этом масштаб ответа зависит от ряда сопутствующих условий (Bedford, 2018). Анализ результатов 120 исследований позволил прийти к выводу, что независимо от состава рациона ксиланаз в большинстве случаев повышала переваривание сухого вещества корма и валовой энергии, но улучшение роста поросят наблюдали только в 32% случаев, у 65% животных ксиланаз не повлияла на рост, и у 3,3% он снизился (Torres-Pitarch et al., 2019). На этом основании нельзя считать, что ферменты слабо работают или не эффективны.

Если вернуться к вышеприведенным исследованиям (Ndou et al., 2015; Choct et al., 2004), то можно заметить, что среди ферментов одного класса (в данном случае ксиланаз) доказано существование ферментов, которые по-разному действуют на одни и те же субстраты. Ферменты, продуцируемые различными микроорганизмами, хотя и действуют на одну и ту же β -1,4-гликозидную связь, имеют различия по сродству к определённым сайтам локализации этой связи. В результате глубина гидролиза и образующиеся продукты будут различаться, с вытекающими последствиями действия на продуктивность и здоровье животных. В группу ксиланаз входит множество различных соединений, отличающихся составом и растворимостью – это тоже влияет на проявление активности отдельных ксиланаз. В подавляющем большинстве исследований индивидуальная специфика ксиланаз не учитывается. Результаты анализов могут изменяться в зависимости от случайного совпадения неучтённых факторов, которые повлияют на действие фермента. Эти неопределённости обусловлены недостаточностью знаний и аналитической техники на настоящем этапе развития науки, о чем заявляли ведущие исследователи, работающие в этом направлении (Cowieson, 2010; Choct, 2017; Bedford, 2018; Petry, Patience, 2020; Baker et al., 2021). Однако это не должно ставить под сомнение эффективность ксиланаз в подходящих условиях.

Оценка действия ксиланаз и других ферментов, добавляемых в корма, осложняется сопутствующими неспецифическими эффектами. Так, при включении ксиланазы в корм для свиней и бройлеров повышалась переваримость протеина и активнее действовала фитаза (Cowieson, Bedford, 2009), т.е. два фермента, с разной специфичностью, не обладающие протеолитическим действием, создавали условия для повышения переваримости протеина. При совместном добавлении в корм ксиланаз и фитаз их действие было аддитивным. Эффективность

одновременного действия ксиланазы и фитазы можно объяснить тем, что их влияние на концентрацию переваренных аминокислот реализовывалось разными, не конкурирующими механизмами, которые ещё недостаточно изучены, и их толкование основывается на предположениях (Крюков и др., 2019). В практических условиях не учитывается наличие в пшенице ингибиторов ксиланаз, которые снижают их действие. На эффективность действия ферментов могут оказывать влияние другие кормовые добавки. В одной из недавних работ при изучении совместного включения в корм ферментного препарата и подкислителя наблюдали меньшее увеличение привесов и эффективности использования корма у цыплят, получавших корм с добавкой только ферментного препарата (Roofchaei et al., 2019). В этом направлении необходимы дальнейшие исследования, поскольку одновременно с ферментами в кормах могут содержаться другие биологически активные вещества, которые влияют на результаты применения ферментов.

Ведущие специалисты в области применения кормовых ферментов считают, что недостаточная изученность действия ксиланаз связана не с ферментами, а обусловлена множественностью и гетерогенностью их субстратов, являясь основной проблемой для прогресса в разработке следующего поколения кормовых ферментов (Choct, 2017). Присутствие ингибиторов ксиланазы в пшенице (Fierens et al., 2007), ячмене (Goesaert et al., 2001) ржи (Goesaert et al., 2002) и кукурузе (Gebruers et al., 2010) оказалось еще одним препятствием, которое ограничивает действие ксиланазы и α -амилазы (Sancho et al., 2003).

Маннаназы и амилазы в кормлении животных

Маннаны, входящие в стенки клеток, в основном представлены глюкоманнанами и галактоманнанами, глюкогогалактоманнанов и глюкурономаннанов (Aman, Graham, 1990). Глюкоманнаны состоят из мономеров глюкозы и маннозы, соединённых β -1-4 связями, тогда как у галактоманнанов к основной цепи из 1-4- β -маннозы у 6-го С-атома присоединена β -галактоза. В эндосперме пшеницы материал клеточной стенки может составлять до 7% (Saulnier et al., 2012). Маннаназы и амилазы в составе полиферментных препаратов начали использовать в последние годы. Субстратом β -маннаназы являются β -маннаны, присутствующие в стенке растительных клеток в виде глюкоманнанов, галактоманнанов. Бэта-маннаназа неспецифично расщепляет β -1,4-гликозидные связи β -маннанов, приводя к образованию олигомеров, тетрамеров и тримеров и в малом количестве - маннозы (Parker et al., 2001). Другая группа исследователей установила, что продукты гидролиза включали 3,3% маннозы, 42% маннобиозы, 20% маннотриозы, 13,3 маннотетраозы и 21% других олигоманнанов (Kusakabe, Takahashi, 1988).

Изучение действия коммерческого препарата, обладающего преимущественно β -маннаназной активностью, на цыплятах кросса Хаббард, показало его благоприятное действие на фоне комбикормов с пониженным содержанием ОЭ (Rehman et al., 2016). В опыте на поросятах-отъёмышках, получавших кукурузно-соевый рацион, β -маннаназа повысила переваримость липидов корма, высоту ворсинок тощей кишки и снизила количество *E. coli* в слепой кишке, однако она не повлияла на рост поросят (Jang et al., 2020). Хотя в ряде работ сообщалось о положительном действии β -маннаназы на скорость роста поросят и усвояемость питательных веществ, эти данные не носят стабильного характера и требуют уточнения условий для успешного их применения (Carr et al., 2014; Huntley et al., 2018). Отсутствие положительного действия β -маннаназы в некоторых случаях могло быть связано с избыточным включением в корм (Zou et al., 2006), учитывая, что её оптимальные дозировки не установлены. Недавно проведенный метаанализ результатов, взятых из 67 рецензируемых публикаций, показал, что включение β -маннаназы в состав полиферментных комплексов улучшало рост поросят и эффективность использования корма (Torres-Pitarch et al., 2019).

В отличие от других карбогидраз, амилаза вырабатывается в организме, обеспечивая высокую переваримость крахмала. Однако, в связи с пониженной секрецией поджелудочной железы в первые 2–3 недели жизни, у цыплят крахмал переваривается не полностью (Noy, Sklan, 1995; Meng et al., 2005). Несмотря на то, что крахмал (α -глюкан) построен только из молекул глюкозы, он не является однородным веществом и существует в различных кристаллических формах с разной растворимостью. При связывании молекул глюкозы α -1,4 связями образуется

линейный полимер – амилоза, появление дополнительных связей у глюкозы в положениях α -1,6 ведут к образованию амилопектина. У цыплят секретруется только α -1,4-глюкозидаза (α -амилаза), которая не расщепляет α -1,6-глюкозидную связь; для её разрыва необходима изо-амилаза (α -1,6-глюкозидаза). Более высокие значения переваримости крахмала у цыплят и скорости их роста наблюдали при соотношении амилоза/амилопектин в корме в пределах 0,23–0,35 (Ma et al., 2020) У поросят-отъёмшией полнее переваривались основные питательные вещества при отношении амилоза/амилопектин в корме, равном 0,14. Увеличение соотношения амилоза/амилопектин до 0,68 угнетало переваривание питательных веществ, но затем оно снова повышалось при соотношении 1,5-2,9 (Gao et al., 2020). Эффективность экзогенной амилазы зависит от её происхождения, т.е. от продуцента, изомера и других факторов (Yuan et al., 2017). В экспериментах и, тем более, в практических условиях на эти особенности не обращают внимания, что приводит к получению не объяснимых разноречивых результатов.

При одновременном включении в корм амилазы и ксиланазы у цыплят наблюдали более высокую переваримость крахмала в подвздошной кишке по сравнению с тощей кишкой (Stefanello et al., 2015). Возможно, это обусловлено тем, что по мере перемещения содержимого по кишечнику повышалось расщепление протеина крахмальных гранул, сопровождающееся улучшением доступности крахмала для амилазы. Химическое действие ферментов хорошо изучено *in vitro*, но как оно проявляется в организме животных, остаётся предметом многочисленных исследований и дискуссий. Названные проблемы связаны с тем, что прямое, т.е. гидролитическое действие амилазы сопровождается рядом отдалённых эффектов, проявление которых не поддаётся прогнозу. Так, установлено, что под влиянием экзогенной амилазы снижается масса поджелудочной железы и уменьшается секреция инсулина, который влияет на рост молодняка (Gao et al., 2008). Предполагают, что экзогенная амилаза влияет на активность дисахаридазы в кишечнике, повышая количество доступной глюкозы и её абсорбцию через экспрессию мРНК переносчика глюкозы (Shimada et al., 2009; Yuan et al., 2017). В результате может повышаться скорость роста цыплят и эффективность использования корма (Gracia et al., 2003; Jiang et al., 2008; Kaczmarek et al., 2014). В других исследованиях добавление α -амилазы в корм не улучшало перевариваемость крахмала (Mahagna et al. 1995) и продуктивность (Yegani, Korver, 2013; Kaczmarek et al., 2014). Несогласованность результатов при изучении влияния амилазы на продуктивность, как указывалось ранее, присуща экспериментам с использованием экзогенных ферментных препаратов, т.е. следует полагать, что неустойчивость результатов присуща не действию ферментов, а обусловлена неодинаковым условиями экспериментов. Оценка действия карбогидраз затруднена тем, что обращают внимание только на их специфическую активность, тогда как в последнее время выявлено, что под действием карбогидраз в стенке кишечника изменяют состав белков, участвующих в обменных процессах с участием липидов, белков и минералов, в которых значительную роль играют факторы окислительно-восстановительного гомеостаза, иммунитета и клеточного цитоскелета (Zhang et al., 2017). Изучение этих процессов только начинает получать развитие, и не исключено участие в них других экзогенных ферментов.

Протеазы. Доля непереваримого протеина, как и других субстратов протеаз, зависит от вида сырья: в соевом шроте она составляет 21%, в сорго – 22, в пшенице – 23, в пшеничных отрубях – 25, в кукурузе – 27, в ячмене – 30%. При этом концентрация отдельных непереваренных аминокислот изменяется не пропорционально переваримости протеина. Так, например, при довольно близких величинах содержания непереваримого протеина в сорго и пшенице, доля непереваримого цистеина была выше в сорго, составив 20% против 13%, и, наоборот: доля непереваримого аланина составила 16 и 31% соответственно (Bao et al., 2013). Экзогенные протеазы должны повышать использование протеина.

Переваривание белка до аминокислот является многостадийным процессом, в котором по очереди принимают участие отдельные ферменты со специфическим действием. Согласованность действия на каждом этапе, в зависимости от свойств белка и возрастных особенностей пищеварения у молодняка животных, изучена недостаточно. В ряде случаев включение экзогенных протеаз в корм сопровождается улучшением продуктивности животных. Протеазы подразделяют на семь групп: серин-, цистеин-, треонин-, аспарагин- и глутаминовые протеазы, металлопротеазы и

аспарагиновые пептидные лиазы (Liu et al., 2017). Классификация протеаз описана в ряде обзоров (Rao et al., 1998; Singh et al., 2016; Razzaq et al., 2019). Уже первые исследования на поросятах, показали, что включение в рацион пепсина и панкреатина приводит к увеличению прироста живой массы, что свидетельствует о недостаточной секреции этих ферментов у поросят-отъемышей. Действие каждого из ферментов было независимым; при их совместном использовании эффект усиливался (Lewis et al., 1955). Независимость действия испытанных ферментов и их взаимодополняющее действие легко объясняется тем, что они расщепляют белок на двух последовательных стадиях пищеварения. Изучение экзогенных протеаз начали спустя 30 лет, при этом использовали фермент, полученный путём микробиологического синтеза (Castanon, Marquardt, 1989).

Обзор ряда работ позволил заключить, что под действием монокомпонентных протеаз переваримость протеина в подвздошной кишке у свиней и птиц в среднем повысилась на 3,7%. Если использовали рацион с низкой переваримостью протеина – в пределах 70%, то количество переваренных аминокислот в большинстве случаев повышалось на 10%, а в тех случаях, когда исходная переваримость протеина составляла 90%, добавление протеазы увеличивало долю переваренных аминокислот не более чем на 2% (Razzaq et al., 2019). Метаанализ результатов исследований, охватывающий период с 1955 по 2017 годы, позволил рассчитать, что протеазы повышали кажущуюся переваримость на 1,2-2,6%, привес у бройлеров – на 1,4% и у свиней – на 4,1%, при этом расход корма на прирост живой массы при выращивании птицы сократился на 0,92% и у поросят – на 4,1%. Птица слабее реагировала на включение протеаз в корма по сравнению с поросятами; авторы предположили, что это связано с более высокой питательностью кормов и продуктивностью птицы в группах сравнения (Lee et al., 2018). Протеазы в ряде экспериментов снижали потребление корма, хотя в некоторых случаях отмечена обратная тенденция. При поверхностном анализе приходят к выводам о противоричности результатов, полученных в разных исследованиях, однако, как указано ранее, приводимые результаты в значительной мере зависят от условий проведения экспериментов, и причины их различий остаются не выясненными.

Положительное влияние кормовых протеаз связывают с их дополнительным действием к эндогенным протеазам, которое сопровождается повышением продуктивных показателей (Walk et al., 2018). Глубокое изучение специфичности действия протеаз было проведено недавно, путём анализа структуры гидролизата соевого протеина двумя коммерческими протеазами, выделенными из *Bacillus amyloliquefaciens* (субтилизинового типа FNA) и из *Nocardopsis prasina* (химотрипсин подобная NPP), а также пепсином и панкреатином свиньи. При этом впервые выявлены различия в составе образующихся пептидов. Совместное действие экзогенных и эндогенных протеаз приводило к более эффективному расщеплению протеина, по сравнению с их действием порознь. Важно отметить, что у пептидов, образующихся в результате гидролиза экзопептидазами, на концевых участках была очень низкая доля цистина (Yu et al., 2020). Предположили, что испытанные экзогенные протеазы полностью не перекрывали спектр действия эндогенных протеаз и не обладали кератинолитической активностью. На основании этих результатов заключили, что экзогенные протеазы лишь частично дополняли действие эндогенных и подвергали расщеплению те связи белковой молекулы, которые недоступны для гидролиза собственными эндопротеазами. Специально отметим, что в проведенном исследовании авторами применён новый прогрессивный метод для характеристики и оценки протеаз, который при его распространении позволит достичь прогресса в понимании механизма их действия. Информация, получаемая с использованием этого метода, впервые применённого в 2020 году, позволяет обосновать требования к параметрам разрабатываемых кормовых протеаз, обеспечивающих более полное расщепление белка.

Отходы, образующиеся при убойе животных и птицы, обрабатывают термически и термохимически и затем включают в состав комбикормов. В процессе обработки происходит неконтролируемое разрушение метионина, триптофана, аспарагиновой и глютаминовой кислот (Слепнева, Хамматова, 2014). В состав отходов входит часть пуха и пера, протеин которых представлен кератином, не перевариваемым у с.-х. животных. Для его расщепления необходимы кератиназы (Е.С. 3.4.99.11), продуцируемые бактериями, актиномицетами и грибами. Кератиназы являются преимущественно внеклеточными сериновыми или металло-сериновыми протеазами

(Gradišar et al., 2005; Brandelli, 2008; Bohacz et al., 2020). Они обладают широкой субстратной специфичностью с оптимумом действия в диапазоне рН 3 - 9 и способны связываться с нерастворимыми субстратами, расщепляя дисульфидные связи, которые недоступны для протеаз других групп (Qiu et al., 2020). Кроме того, они способны расщеплять белки растительного происхождения (Lin et al., 1996; Gradišar et al., 2005).

Первой охарактеризованной кератиназой была KerA, продуцируемая штаммом *Bacillus licheniformis*, которая принадлежит к семейству сериновых протеаз S8 (Lin et al., 1992). Преимущество кератиназ перед другими протеазами заключается в том, что они могут действовать во всех отделах ЖКТ, переваривая многие растворимые и нерастворимые белки (Brandelli et al., 2010). Большинство кератиназ также расщепляют такие трудно переваримые субстраты, как коллаген и эластин (Suzuki et al., 2006). В зависимости от источника кератина, при их действии могут образовываться пептиды различного состава, обладающие противомикробным, противовоспалительным, антиоксидантным, противодиабетическим свойствами. Возможность расщеплять растительные белки с дисульфидными связями является дополнительным поводом к использованию кератиназ в составе кормов.

В составе соевого шрота содержатся лектины, ингибиторы протеаз, глицинин и β -конглицинин, которые устойчивы к действию эндогенных протеаз и проявляют антипитательное действие (Clemente et al., 2008; Moreno, Clemente, 2008). Существует реальный риск неполного переваривания протеина соевого шрота (Chen et al., 2020). Обычно внимание уделяют ингибиторам трипсина и химотрипсина, на которые приходится до 7-9% от массы белка сои (Penha et al., 2007). Ингибитор Кунитца инактивируется при термообработке, тогда как ингибитор Боумана-Бирка устойчив к действию высокой температуры (Miura et al., 2005), поэтому тостирование соевого шрота не обеспечивает полной инактивации ингибиторов. Содержащиеся в сое глицинин и β -конглицинин негативно влияют на структуру и иммунную функцию кишечника у поросят (Yoo et al., 2009). В этих белках отдельные полипептиды связаны между собой дисульфидными связями (Fukushima, 2011), что придаёт им устойчивость при переваривании эндогенными ферментами. Для преодоления действия ингибиторов трипсина, лектина и глицинина можно использовать кислую протеазу, расщепляющую названные белки, но она не действовала на лектины; щелочная протеаза оказалась неактивной по отношению к этим субстратам (Hessing et al., 1996). Гидролиз глицинина и β -конглицинина происходил под действием кератиназы, продуцируемой *Bacillus licheniformis* PWD-1 (Wang et al. 2011). Включение её в кукурузно-соевый рацион, содержащий 18% протеина, в дозе 0,05, 0,10 и 0,15% привело к увеличению прироста живой массы; в результате она приблизилась к таковой у цыплят, получавших корм с 21% протеина (Odetallah et al., 2003). Кератиназа Versazyme VZ, на фоне комбикормов с различным содержанием протеина улучшала рост бройлеров, но более высокое относительное увеличение прироста наблюдали при скормливании кормов с пониженным уровнем протеина (Wang et al., 2006). Сравнительное изучение коммерческих ферментов Cibenza DP100 и Ronozyme ProAct, показало, что последний препарат активнее расщеплял кератин. Его положительное действие выходило за рамки влияния на обмен белка и аминокислот. В частности, была установлена активация генов, ответственных за транспорт пептидов и переваривание крахмала (Navone, Speight, 2018; Cowieson et al., 2019). По-видимому, это также связано с тем, что протеазы разрушали антигенные белки и происходила нормализация состояния слизистой оболочки кишечника и здоровья в целом (Zuo et al., 2015; Cowieson, Roos, 2016).

Известны десятки продуцентов кератиназ; в некоторых случаях выделены и охарактеризованы чистые ферменты, однако остаются трудности в оценке свойств кератиназ, которые сопряжены с отсутствием общепринятых методов анализа, что затрудняет выявление и сравнение истинных кератиназ. Количество секвенированных протеаз с кератинолитической активностью ограничено (по состоянию на 2020 г.), поэтому их трудно идентифицировать. При изучении активности *in vitro*, вероятно, ориентируются на условия культивирования их продуцентов, что создаёт различия в применяемых методах активности кератиназ по температуре, рН, типам и концентрации буферов, субстратам и их предварительной обработке; это исключает возможность получения сопоставимых данных для сравнительных выводов (De Oliveira Martinez et

al., 2020). Исследования по изучению кератиназ и созданию их продуцентов – это новое направление, которое развивается в последнее десятилетие, однако коммерческие структуры, используя первые успехи и рекламу, выводят на рынок недостаточно проверенные препараты, поэтому не ясно, какие из них себя оправдают. Для принятия решения об использовании кератиназ в промышленных условиях необходимо ориентироваться на проверенных производителей и проводить испытание ферментов на базе планируемой рецептуры комбикормов.

Протеазы могут влиять на микробиом кишечника путём уменьшения приживаемости энтеротоксигенных *E. coli* в кишечнике, сокращать случаи диареи и отход поголовья (Mynott et al., 1996). Включение в рацион, приготовленный на основе пшеницы, протеазы в дозах 0, 2500, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000 или 100000 НУТ/кг корма показало, что наибольшие значения прироста живой массы и эффективности использования корма у цыплят наблюдались при дозе 10000 НУТ/кг корма. Активность, в 10 раз превышающая оптимальную, не оказывала отрицательного влияния на показатели продуктивности и здоровья в период от 1 до 42 дней (Kocher et al., 2015). Несмотря на то, что многократная передозировка протеазы в условиях конкретного исследования не оказала негативного влияния на продуктивность бройлеров, повышать дозировки экзогенной протеазы нецелесообразно с экономической точки зрения.

Фитазы. Применение фитаз в кормлении животных чаще сопровождается положительными результатами по сравнению с другими ферментами, что обусловлено лучшей их изученностью и направленностью действия на переваривание единственного субстрата - фитиновой кислоты (мио-инозитол-1,2,3,5-дис-4,6-гексаксидигидрофосфат, ФК). Источником ФК являются фитаты, которые представлены множеством соединений с различными свойствами. Содержание фитатов в кормах определяют в специализированных лабораториях, поэтому сырьё чаще и более чётко контролируют по содержанию фитатов, по сравнению с полисахаридами. Нестабильность результатов при применении фитаз обусловлена не столько свойствами ферментов, сколько различиями в структуре фитатов и доступности из них ФК. Фитиновой кислоте присуще антипитательное действие, вызванное образованием высокоактивных катионов, которые вступают в реакцию с положительно заряженными ионами питательных веществ, вызывая повторное образование фитатов с разной растворимостью и доступностью для действия фитаз и других пищеварительных ферментов. В 2019 и 2021 г.г., авторами настоящей статьи опубликованы обзоры по изучению влияния фитатов и фитаз на продуктивность животных и по механизму действия фитазы (Крюков и др. 2018, 2019, 2021). Лучшая изученность действия фитаз, по сравнению с карбогидразами и протеазами, обеспечивает большую надёжность прогнозирования ожидаемой продуктивности.

У бройлеров доступность фосфора из пшеницы при использовании кормовой фитазы возросла с 30 до 46%, а из кукурузы – до 59%, при этом ретенция фосфора из пшеницы увеличилась в 2 раза, а из кукурузы – на 17% (Leske, Coon, 1999). Аналогичные данные были получены другими исследователями (Zeller et al., 2015; Bello et al., 2019). Фитазы отличаются по активности в верхних отделах кишечника, однако они мало различаются в подвздошной кишке. Расщепление фитатов в слепой кишке достигало 93-98% независимо от источника фитазы (Zeller et al., 2015). С увеличением содержания фитатов в кормах происходит снижение эффективности использования питательных веществ в результате угнетения секреции ферментов, переваривающих пищу, и всасывания (Cowieson et al., 2004; Ravindran et al., 2006). Увеличение доступности аминокислот, обменной энергии и ряда микроэлементов, сопутствующее скармливание фитаз, обусловило их популярность. Впоследствии этот эффект, как не связанный с прямой функцией фермента, назвали «экстрафосфорным» (Siegert et al., 2019; Moss et al., 2019; Walk, Oluokosi, 2019). По сути на этом основано преодоление антипитательного действия. Для принятия решения о применении кормовой фитазы целесообразно определить содержание фитатов в кале (помёте), которое отражает долю нерасщеплённых фитатов. Снижение их концентрации под действием тестируемого фермента будет свидетельствовать о возможном повышении продуктивности животных.

Трудности при выборе наиболее эффективного препарата кормовой фитазы обусловлены тем, что они должны обеспечивать расщепление ФК на протяжении ЖКТ, минимум до конца подвздошной кишки. При перемещении корма по ЖКТ, фитаты и фитазы попадают в кислую, а затем нейтральную среду. В кислой среде достигается максимальное растворение фитатов и

образование катионов ФК, которые доступны для действия фитаз, поэтому фитазы должны проявлять высокую активность в среде желудка. Катионы ФК и её низших фосфорных эфиров, поступая в кишечник, способны образовывать вторичные фитаты, которые тоже требуют расщепления. Анализ активности фитаз в химусе, взятом из зоба, желудка, двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок, показал, что она остаётся довольно высокой, составляя 68-97% от исходной (Elkhalil, 2007). Самая низкая активность проявлялась в химусе желудка, хотя в нём ожидается наибольшая растворимость фитатов. Изучение *in vitro* семи известных коммерческих фитаз показало, что наиболее широкий диапазон проявления активности в зависимости от pH среды показали Phyzyme XP и Quantum Blue: 3,0-5,0 (табл. 2.), Фитаза Axtra PHU была активна в узком диапазоне pH (Menezes-Blackburn et al, 2015), но при этом она показала высокую активность при значении pH, характерном для желудка и была устойчива к действию пепсина.

Таблица 2. Основные свойства коммерческих фитаз при исследовании *in vitro*

Торговое название	Quantum	Quantum Blue	Phyzyme XP	Axtra PHU	Ronozyme Hiphos	Ronozyme NP	Natuphos
Поставщик	AB Vista	AB Vista	Danisco	Danisco	Novozymes/DSM	Novozymes/DSM	BASF
80% активности в диапазоне pH*	4,0–5,0	3,5–5,0	3,0–5,0	3,0	3,0–4,5	4,5–5,5	4,5–5,5
Активность, при pH 3, %	92,5	101,3	82,8	235,1	144,7	12,5	64,2
Активность, при pH 7, %	0,8	2,2	1,7	0,5	0,6	7,8	7,0
Km (мкМ) при pH 3,0; 37°C	257	178	302	311	427	98	142
- " - + пепсин, %	93	98	92	85	92	34	47
Km (мкМ) при pH 5,0; 37°C	228	142	285	272	364	75	35
Активность фитазы, необходимая для распада ФК или высвобождения неорганического фосфора							
50% расп. ФК	148	211	140	129	269	480	503
50% неорг. P	1459	780	636	654	841	1719	1773

Примечание: *активность фитазы при pH 5,5 принята за 100%.

Изученные фитазы были активны при pH 3 и показали практически следовую активность при pH 7. Переваривание ФК - это многоступенчатый процесс (Крюков и др., 2021), и отщепление первого и последующего фосфат-иона ведет к снижению её антипитательного действия, но не полного высвобождения фосфора. Для расщепления 50% ФК требуется в несколько раз меньшая активность по сравнению с высвобождением 50% неорганического фосфата (табл. 3). Наименьшая активность для высвобождения 50% неорганического фосфора наблюдалась при использовании фитаз Quantum Blue, PhyzymeXP, AxtraPHU и Ronozyme Hiphos. Анализируя полученные результаты, авторы приходят к выводу, что различия между коммерчески доступными фитазами в модельной системе *in vitro* не отражают их эффективность *in vivo*. Необходимы дальнейшие исследования для поиска моделей, реально отражающих действие фитаз в организме животных (Menezes-Blackburn et al, 2015). Считают, что переваривание фитатов зависело не от активности ферментов, а в большей мере от доступности субстрата. Недавно был установлен интересный факт: при включении в рацион бойлеров фитазы в дозе 500 FTU/кг в тощей кишке бройлеров повышалась активность эндогенной щелочной фосфатазы, которая расщепляет трудно растворимые фитаты двухвалентных металлов (Akter et al., 2017). Переваривание фитатов может зависеть от происхождения фитазы (табл. 2). Возможно, что бактериальные фитазы лучше действуют по сравнению с грибными, так как их молекулы имеют меньший размер и легче проникают внутрь растительных клеток, где содержатся резервные фосфаты. У птицы основным местом проявления активности фитаз является желудок, поскольку в нём максимальная кислотность, способствующая проявлению активности; в тонком кишечнике среда близкая к нейтральной и неблагоприятна для проявления активности. Кроме того, фитаза, как и другие белки, подвержена протеолизу эндогенными ферментами (Simon, Igbasan, 2002). По сравнению с фитазой грибов, фитаза *E.coli* оставалась активной вплоть до области подвздошной кишки, демонстрируя большую устойчивость к протеазам (Onyango et al. 2005). По сравнению с фитазой грибов, фитаза *E.coli* оставалась активной вплоть до области подвздошной кишки, демонстрируя большую устойчивость к протеолизу (Onyango et al. 2005). Учитывая, что фитаты присутствуют на протяжении всего ЖКТ, необходимо

выбирать бактериальные ферменты, сохраняющие активность в тонком кишечнике и подвздошной кишке.

Скармливание цыплятам-бройлерам кормов с добавкой фитазы повышало живую массу и содержание минеральных веществ в костях; более выраженное действие наблюдали при низком содержании в комбикорме нефитатного фосфора. Было замечено, что под влиянием фитазы продуктивность повышалась при достаточном уровне минерального фосфора (Cabahung et al., 1999). Это даёт основание предполагать, что влияние фитазы на продуктивность может быть опосредовано и через другие механизмы, не связанные с её прямой функцией (Liu et al., 2008). В большинстве работ основное внимание уделяют специфической функции фитаз, отражающей количество фосфора, высвобождаемого из фитатов. Это внимание закрепилось исторически в связи с целевым созданием фитаз. Изучая метаболизм ФК, установили, что антипитательное действие фитатов обусловлено высвобождением из них катиона ФК и метаболитов первых стадий дефосфорилирования – ФК 5-4. В связи с этим для преодоления антипитательного действия фитатов следует учитывать скорость дефосфорилирования на начальных этапах (Żyła et al., 2004). В практических условиях, возможно, эффективным будет включение в корм нескольких фитаз с разным оптимумом рН (Żyła et al., 2004, 2013; Elkhail et al., 2007; Ennis et al., 2020). При применении фитаз в экспериментах может отмечаться несогласованность изменений некоторых биохимических параметров и продуктивности у бройлеров. По нашему мнению, улучшение роста птицы может быть обусловлено непрямым действием фитазы, который не всегда учитывают. Зоотехники, отдавая приоритет продуктивным показателям, относят достигнутые результаты к эффектам действия применённого фермента.

Полиферментные препараты

Существует два направления в оценке действия кормовых ферментов. Первое, наиболее обсуждаемое и очевидное, связано с прямой функцией ферментов - с повышением переваримости питательных веществ корма. Оно интенсивно изучается и непосредственно связано с выявлением количественных характеристик гидролитического расщепления составляющих корма (Bedford, 2000). Второе направление связано с опосредованным влиянием ферментов на физиологию пищеварения в целом, здоровье кишечника, иммунитет и сохранность поголовья, но на бытовом уровне его относят к действию ферментов. Большинство коммерческих кормовых ферментных препаратов, заявленных в качестве моноферментов, часто представляют собой продукты, которые содержат примеси других ферментов (Masey O'Neill et al., 2014), не указываемые в технических характеристиках; в результате препараты характеризуются не полностью. Исследователи, и, тем более потребители, на это не обращают внимания, хотя сопутствующие активности влияют на свойства препаратов. Это может быть одной из причин различной эффективности однотипных ферментных препаратов, произведенных по разным технологиям. Специфика действия ферментов и состава кормов приводит к тому, что использования одного фермента часто недостаточно для получения максимальной пользы; необходимо применять несколько различных ферментов, которые путём взаимодополняющего действия обеспечивают лучшее использование питательных веществ (Tejedor et al., 2001). Ферментные препараты с одной активностью (моноферменты) целесообразно использовать в тех случаях, в которых доказана ограниченность переваривания питательных веществ на конкретной стадии, которую можно устранить добавлением в корм необходимого фермента. Экзогенные ферменты должны дополнять комплекс пищеварительных ферментов. Сложнее эту задачу решить по отношению полиферментным препаратам, поскольку действие входящих в их состав ферментов может сопровождаться аддитивными эффектами, которые проявляются на неспецифическом уровне.

Предлагаемые на рынке полиферментные препараты, обладающие несколькими активностями, можно получать смешиванием ранее произведённых препаратов, обладающих моноактивностью. Иногда полиферментные препараты могут представлять собой естественный комплекс ферментов, образуемых одним продуцентом в процессе роста; их называют ферментными «коктейлями». На примере штамма *Aspergillus tamarii* URM 4634, установили, что соотношение и концентрация образующихся фитазы, ксиланазы и целлюлазы зависят от состава культуральных

сред. Из образующихся ферментов наибольшую устойчивость к пепсину проявляла фитаза – 89%; трипсин снизил её активность и активность ксиланазы по отношению к исходной, тогда как активность целлюлазы необъяснимо возросла в 2 раза. В зависимости от pH среды изменялась их термоустойчивость. Знания о влиянии температуры, pH и стабильности в процессе производства комбикормов помогают оптимизировать состав и эффективность использования полиферментных комплексов (Gomes et al., 2014). По нашему мнению, предпочтение следует отдавать полиферментным продуктам, которые производят путём смешивания моноферментных препаратов, поскольку последние созданы с гарантированными показателями целевой активности каждого фермента.

Обобщение результатов применения ферментов привело к убеждению о необходимости использования карбогидраз, позднее к ним добавили фитазы. Среди карбогидраз наиболее широкое распространение получили ксиланазы, целлюлазы, амилазы и глюканазы. Вначале их применяли для снижения вязкости кишечного содержимого, чтобы предупредить торможение действия собственных ферментов и всасывания продуктов переваривания (Choct, 1997, 2006). Позднее установили положительное действие карбогидраз при включении их в корма, приготовленные на основе кукурузы или сорго, которые не создавали проблем с вязкостью химуса в ЖКТ (Cowieson, 2010). Основная доля энергии в зернах злаков связана с крахмалом, который находится внутри клеток растений. Их стенки построены из НПС, ограничивающих доступность собственных ферментов внутрь клеток. Следовательно, добавление в корм ферментов, способных разрушать полисахариды клеточной стенки, обеспечивает лучшую доступность питательных веществ для ферментов поджелудочной железы (Cowieson, 2005). Кроме того, расщепление клеточных стенок создаёт условия для более эффективного действия других экзогенных и эндогенных ферментов. Как указано выше, в последнее время предложено дополнительное объяснение влияния карбогидраз на процессы пищеварения (Lee et al., 2017), которое не связано с их гидролитическим действием и ещё недостаточно изучено. Иногда полисахариды клеточных стенок растений связывают с поверхностными оболочками зерна, хотя в эндосперме пшеницы концентрация клеточных стенок тоже достаточно велика, достигая 7% (Saulnier et al., 2012). Эти результаты дополнительно свидетельствуют о том, что карбогидразы следует считать обязательным компонентом полиферментных препаратов. Включение в их состав других ферментов обосновывают исходя из субстратной специфичности корма. Анализируя результаты многочисленных исследований, на основе обобщений можно предложить ряд рецептов полиферментных препаратов, однако, в связи со слабой изученностью специфики строения субстратов корма, их связями с другими веществами, убедиться в их эффективности можно только после испытаний на животных.

Изучение *in vitro* изменений концентрации полисахаридов пшеницы под действием карбогидраз показало, что наиболее активно их содержание снижалось под влиянием целлюлазы + ксиланазы/глюканазы (табл. 3).

Таблица 3. Остатки компонентов НПС в среде после инкубации *in vitro* пшеницы с карбогидразами

	Моносахариды, г/кг				Общ. НПС
	Арабиноза	Ксилоза	Манноза	Галактоза	
Без ферментов	19,9 ^a	24,7 ^a	3,6	3,4	87,8 ^a
Целлюлаза (Ц)	12,2 ^{cd}	15,9 ^b	2,8	3,2	65,2 ^{cd}
Ксиланаза (К)	14,7 ^b	14,7 ^c	2,9	3,7	68,7 ^b
К + Ц	13,1 ^{bc}	12,3 ^{cd}	3,3	3,8	62,0 ^d
Ксиланаза/глюканаза (К/Г)	12,3 ^{cd}	13,1 ^{cd}	3,3	3,1	63,2 ^d
К/Г + Ц	10,6 ^d	11,0 ^d	2,8	2,9	55,0

Примечания: различие средних значений с разными надстрочными знаками статистически значимо ($P < 0,05$). Адаптировано по: (Meng et al., 2005).

Расщепление изученных полисахаридов, кроме ксиланов, под влиянием ксиланазы было слабее, чем под влиянием целлюлазы. Действие ксиланазы усиливалось в присутствии глюканазы и ещё больше – в присутствии целлюлазы + глюканазы (Meng et al., 2005). Приведенные данные

демонстрируют, что одни ферменты создают условия для действия других. Известно, что эндоксилаказы расщепляют арабиноксиланы путем гидролиза основной цепи ксилана, тогда как множественные ответвления от неё в виде остатков арабинозы тормозят действие ксиланаз. Включение в состав кормового фермента арабинофуранозидазы приводит к отщеплению арабинозы от основной цепи ксилана, открывая доступ к ней эндоксилаказы, и повышает общую эффективность ферментного препарата (De La Mare et al., 2013; Cozannet et al. 2017).

Изучение влияния вышеназванных ферментов с добавлением пектиназы в пшенично-соевый рацион, показало, что переваримость НПС питательных веществ в подвздошной кишке в условиях эксперимента под влиянием различных сочетаний ферментов повысилась более чем в 2 раза и мало различалась в испытанных вариантах (табл. 4). Использование изучаемых ферментов сопровождалось повышением расщепления крахмала и протеина, хотя ни один из них не обладал амилолитической или протеолитической активностью. Указанное действие вызвано вторичным действием метаболитов, образующихся при переваривании субстратов. Не исключено проявление положительного действия в результате разрушения полисахаридов клеточных стенок

Таблица 4. Влияние экзогенных карбогидраз на переваримость питательных веществ и рост цыплят

	Переваримость, %			Прирост ЖМ, г/гол.	Корм/прирост ЖМ, г
	НПС	Крахмал	Протеин		
Без ферментов	6,3	92,6	73,2	436 ^b	1,53 ^a
Ц+П	14,0	94,7	76,3	459 ^a	1,50 ^b
Ц+КГ	14,0	95,7	77,5	470 ^a	1,48 ^b
Ц+П+КГ	12,8	95,6	77,2	456 ^a	1,49 ^b
Ц+ П+КГ+МЦ	14,9	96,7	79,8	466 ^a	1,45 ^c

Примечания: обозначения ферментов: Ц- целлюлаза, П- пектиназа, КГ- ксиланаза +глюканаза, МЦ- маннаназа +целлюлаза. ^{a-c} различие средних значений с разными надстрочными знаками статистически значимо (P<0,05). Адаптировано по: (Meng et al., 2005).

Испытанные рецепты добавок ферментов повышали прирост живой массы и эффективность использования корма, однако сочетания карбогидраз *in vivo* не проявляли аддитивного действия и примерно одинаково повышали доступность эндогенных ферментов для переваривания протеина и крахмала. Исходя из данных табл. 3 и 4, следует, что результаты измерений действия ферментов *in vitro* и *in vivo*, полученные даже в одной лаборатории, совпадали по направленности действия только в том случае, когда в корм включали одновременно все испытанные ферменты. Принципиальное различие по условиям действия ферментов *in vitro* и *in vivo* заключается в том, что в первом случае на субстраты действуют только ферменты, включённые в среду инкубации, тогда как *in vivo* экзогенные ферменты, помимо расщепления НПС, дополнительно создавали условия для действия эндогенных ферментов на белки, липиды, крахмал и другие субстраты, находящиеся внутри клеток. В результате прирост продуктивности всегда отражает суммарный эффект дополнительного действия эндогенных и экзогенных ферментов. Таким образом, окончательный вывод об эффективности сочетания отдельных ферментов в полиферментном препарате можно установить только в исследованиях на животных. Эта оценка важна для практического животноводства, но она не позволяет в научном плане выявить вклад и значимость каждого фермента для повышения продуктивности (Masey O'Neill et al., 2014). В условиях практического животноводства проблему для прогнозирования эффективности действия ферментов создаёт значительная вариабельность состава клеточной стенки растений и частая изменчивость набора компонентов рациона, обуславливающая изменения концентрации потенциальных субстратов и их соотношения (Theander et al., 1989). Многочисленные наблюдения позволили прийти к выводу о целесообразности использования полиферментных препаратов, особенно препаратов с карбогидразной активностью (Slominski, 2011).

Влияние состава полиферментных препаратов на продуктивность

Кормовые добавки с полиферментной активностью используют в коммерческих рационах для бройлеров в течение длительного времени (около 20 лет). В одних случаях совместное включение в кукурузно-соевый рацион амилазы, ксиланазы и протеазы повышало продуктивность бройлеров (Tang et al., 2014; Cowieson, Ravindran, 2008;), тогда как другие исследователи не нашли преимуществ при применении поликарбогидраз по сравнению с препаратами, обладающими одной активностью (Masey O'Neill et al., 2014). Испытание на поросятах полиферментного «коктейля» с преимущественным содержанием эндо- β -1,4 ксиланазы и эндо- β -1,3(4)-глюканызы, показало, что на фоне кукурузно-соевого рациона под влиянием ферментов произошло снижение прироста живой массы на 15%. В этом же опыте на фоне рациона, включающего в равных дозах пшеницу, рожь и ячмень, среднесуточный прирост под влиянием ферментного препарата возрос на 17%, и живая масса поросят была выше, чем на фоне кукурузно-соевого рациона. Расход корма на прирост снизился у поросят, получавших корм, приготовленный на основе смеси злаков. Переваримость крахмала, протеина и энергии была ниже под влиянием ферментного препарата у поросят, получавших кукурузно-соевый рацион (Willamil et al., 2012). Интересно отметить, что у поросят, потреблявших корм, состоящий из смеси злаков, вязкость кишечного содержимого была примерно в 2 раза выше, чем у получавших, корм с кукурузой, и она повышалась под влиянием ферментного препарата на фоне обоих рационов. Повышение вязкости могло быть обусловлено расщеплением нерастворимых полисахаридов на сравнительно крупные части. Вязкость химуса не всегда снижается под влиянием карбогидраз и не всегда является фактором, ограничивающим продуктивность. Физиологические наблюдения не позволили объяснить этот феномен. Приведенные данные, очередной раз подтверждают важность учёта состава субстратов в скормливаемых кормах и их физического состояния. Комментируя результаты опыта, следует обратить внимание, что в связи с тем, что ферментный препарат представлял коктейль ферментов, то испытать действие каждого из ферментов в отдельности было невозможно, чтобы определить их индивидуальный вклад в полученный результат.

Эффективность применения экзогенных ферментов в свиноводстве менее устойчива по сравнению с птицеводством. Причины этих различий иногда связывают с различиями в типах и качестве зерна, возрастом животных и свойствами используемых ферментов (Yi et al., 2013). Безусловно, эти факторы играют определённую роль, однако эти доводы не могут быть определяющими, так как набор сырья в комбикормах для птицы и свиней практически одинаков. Главной причиной в данном случае являются существенные различия в строении пищеварительной системы и времени пребывания перевариваемого корма в желудке и кишечнике, а также особенностями самого процесса переваривания корма. Тем не менее, в ряде случаев влияние ферментов у свиней и птиц по направленности действия совпадает (Cowieson, Bedford, 2009).

В эксперименте на поросятах-отъёмышках было показано успешное применение комплексного препарата, содержащего ксиланазу, амилазу и протеазу. Под влиянием ферментов значительно возрастала обменная энергия, переваримость протеина и ряда аминокислот. В подвздошной и слепой кишках возрастала концентрация масляной, пропионовой и уксусной кислот, что привело к снижению количества колиформных бактерий и увеличению количества лактобацилл. В результате повысился прирост живой массы поросят в первые 7 дней после отъёма и в последующие 3 недели (Yi et al., 2013). Роль отдельных ферментов в составе применённого препарата экспериментально не была установлена.

У цыплят-бройлеров, получавших корм, приготовленный на основе кукурузы, было изучено влияние амилазы, ксиланазы и протеазы (Wealleans et al., 2017). Наибольшее влияние оказали карбогидразы на переваримость крахмала, что связано с присутствием в их составе амилазы, тогда как дополнительное включение протеазы на этот показатель не повлияло (табл. 5). Добавление протеазы к карбогидразам не повлияло на переваримость протеина и на ретенцию азота, но в её присутствии существенно повысилась переваримость жира. Живая масса цыплят возросла под влиянием карбогидраз, но ещё больше - при дополнительном включении в корм протеазы.

Добавление протеазы к карбогидразам не повлияло на переваримость протеина и на ретенцию азота, но в её присутствии существенно повысилась переваримость жира. Живая масса

цыплят возросла под влиянием карбогидраз, но ещё больше - при дополнительном включении в корм протеазы. Авторы не дали объяснения выявленным изменениям.

Таблица 5. Влияние кормовых добавок карбогидраз и протеазы на продуктивность и использование питательных веществ у цыплят-бройлеров

Показатели	Основной рацион (ОР)	ОР + ксиланаза + амилаза	ОР + ксиланаза + амилаза + протеаза
Живая масса в 42 дня, г	3166 ^b	3235 ^{a,b}	3323 ^a
Расход корма на 1 кг привеса, кг	1,64	1,62	1,60
Переваримость в подвздошной кишке, %			
Протеин	83,3	84,1	84,1
Крахмал	92,7 ^c	97,3 ^a	97,5 ^a
Жир	86,2 ^c	88,8 ^{a,b}	89,9 ^a
ОЭ _{пвк} , ⁺⁺ , ккал/кг	3192 ^c	3268 ^{a-c}	3266 ^{a-c}
Ретенция азота, %	68,9 ^b	70,6 ^{a,b}	69,1 ^b

Примечания: ^{a-c} различие средних значений с разными надстрочными знаками статистически значимо (P<0,05). Адаптировано по: (Wealleans et al., 2017). ⁺⁺ содержание энергии в 1 кг СВ корма – содержание энергии в 1 кг СВ содержимого на терминальном участке подвздошной кишки (прим. ред.)

Улучшение роста цыплят наблюдали при использовании полиферментного препарата, содержавшего ксиланазу, амилазу, протеазу и фитазу (Cowieison, Adeola, 2005). В эксперименте цыплята получали кукурузно-соевый комбикорм, с пониженным уровнем обменной энергии и доступного фосфора. Включение в состав корма 2-й группы карбогидраз и протеазы не изменило обменной энергии корма (ОЭ), переваримости протеина и фосфора, но существенно повысило живую массу и эффективность использования корма по сравнению с цыплятами 1-й группы, получавшими корм без ферментов (табл.6). Увеличение согласно схемы опыта в корме 3 группы в 2 раза концентрации карбогидраз и протеазы максимально, по сравнению с другими группами, повысило ОЭ корма и переваримость протеина, что привело к существенному увеличению живой массы цыплят. Добавка в корм 4-й группы только фитазы повысила концентрацию переваренного фосфора, но не повлияла на переваримость протеина и, даже, снизила ОЭ корма по сравнению с кормом 1-й группы, хотя при этом рост не ухудшился по сравнению с таковым у цыплят 2-й группы. Планируемое удвоение дозы фитазы показало слабую тенденцию к повышению изучаемых параметров.

Таблица 6. Влияние содержания ферментов в корме на продуктивность бройлеров

№ п. п.	Активность ферментов в корме, ед./кг*	Переваримость				Живая масса, г **	Корма на прирост, кг/кг		
		Ксила-наза	Ами-лаза	Про-теаза	Фи-таза				
1	ОР	202	100	100	327	2712	77,2	877,6	1,742
2	ОР + 100 мг КАП ^a	521	1159	1990	287	2723	77,6	939,7	1,596
3	ОР + 200 мг КАП	901	2043	4021	256	2925	80,0	965,7	1,588
4	ОР + 100 мг Фитаза ^b	190	100	100	886	2649	77,1	931,7	1,614
5	ОР + 200 мг Фитаза	160	100	100	1215	2691	78,1	948,2	1,591
6	ОР+100мг КАП + 100мг Фитаза	590	1319	2102	1124	2716	78,1	1000,2	1,561
7	ОР+200мг КАП + 200мг Фитаза	855	2053	4390	1593	2791	78,7	1014,9	1,572

Примечания: *Согласно результатам анализа; **Живая масса в 28 дней. В 1 г КАП содержалось 1500 ед. ксиланазы, 2000 ед. амилазы и 20000 ед. протеазы. В 1 г фитазы содержалось 5000 ед. фитазы. Адаптировано по: (Cowieison, Adeola, 2005).

овместное использование карбогидраз, протеазы и фитазы в рационе 6-й группы не повлияло на ОЭ корма, по сравнению с контролем, но при этом отмечен максимальный рост цыплят и снижение расхода корма на прирост по сравнению с цыплятами 1–5-й групп. Увеличение в 2 раза дозы испытуемых ферментов в рационе 7-й группы повысило ОЭ корма и проявило слабую тенденцию к повышению живой массы и оплаты корма по сравнению с цыплятами 6-й группы. В большинстве случаев фитаза повышает продуктивность бройлеров, однако отсутствие её эффекта в описанном исследовании не нашло объяснения (Cowieson and Adeola, 2005). В эксперименте увеличение доз ферментов не приводило к увеличению переваримости питательных веществ, что могло быть обусловлено исчерпанностью доступных субстратов для действия ферментов при предыдущей меньшей дозе.

В цитированном исследовании полученные результаты обсуждены в соответствии со схемой опыта, однако фактическое содержание ксиланазы в вариантах 2, 3, 6 и 7 было существенно выше заявленного.

В связи с тем, что активность ферментов не соответствовала схеме опыта, выводы необходимо связывать с фактической активностью ферментов. Последняя не отражает соотношение активностей, предусмотренных исследователями. В связи с этим влияние ферментов на рост и расход корма могло быть обусловлено другими воздействиями, не совпадающими с предусмотренными методикой исследования.

Скармливание цыплятам-бройлерам комбикорма, со сниженной питательностью, к которому добавляли карбогидразы и фитазу или их совместно, обеспечило до 21-дневного возраста наилучший рост в присутствии карбогидразы, тогда как действие фитазы и фитазы + карбогидразы оказалось слабее. С 22 по 42 день опыта и в расчёте за весь период с 1 по 42 день прирост живой массы под влиянием испытанных вариантов добавок оказался практически одинаковым. Несмотря на полученные результаты, авторы пришли к выводу о том, что испытанный препарат карбогидразы является эффективной добавкой в качестве второго фермента после фитазы (Mohiti-Asli et al., 2020), хотя из результатов исследования следует, что первым ферментным препаратом являлись карбогидразы.

В большинстве случаев действие ферментов более выражено у цыплят и поросят раннего возраста, т. е. на фоне стартерных кормов. Однако при удачно обоснованном составе и дозировках ферментных препаратов они положительно влияют на продуктивность особей старшего возраста. Так, на курах несушках при скармливании кукурузно-соевого комбикорма со сниженным содержанием протеина и энергии наблюдали снижение яйценоскости. На этом фоне включение в корм полиферментного коммерческого препарата, приготовленного путём смешивания продуктов ферментации грибов *Trichoderma reesei*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger* и содержащего несколько карбогидраз, протеазу и фосфатазу, привело даже к некоторому увеличению продуктивности по сравнению с группой, получавшей сбалансированный по питательности комбикорм. Однако, если в рационе дополнительно был понижен уровень фосфора, то яйценоскость в присутствии ферментного препарата снизилась до уровня в группе положительного контроля (Lee et al., 2014). Положительное влияние полиферментных препаратов на продуктивность несушек наблюдалось ранее другими исследователями (Adeola, Cowieson, 2011; Ravindran, 2013). Использование препаратов с обоснованным набором активностей позволяет преодолеть действие антипитательных факторов и повысить использование питательных веществ. Проводится много исследований по выявлению действия полиферментных смесей на продуктивность животных. Результаты этих исследований носят фактографический характер и локальную ценность; они не позволяют обосновать стратегию разработки и применения многокомпонентных препаратов.

В связи с успешным применением фитазы, изучению её сочетания с другими ферментами уделено много внимания. В ряде исследований показано, что добавление фитазы и карбогидраз к рационам на основе кукурузы, пшеницы или ячменя является более полезным с точки зрения использования питательных веществ, чем добавление ферментов по-отдельности (Ravindran et al. 1999; Juanpere et al., 2005; Selle et al. 2009; Woyengo et al. 2010). Однако совместное применение фитазы с карбогидразами не всегда бывает успешным (Selle et al., 2003; Wu et al., 2004; Juanpere et

al., 2005; Olukosi, Adeola, 2008; Woyengo et al., 2008). Из цитированных источников следует, что противоречивые результаты получают даже те авторы, которые в других исследованиях получали позитивные результаты. Аддитивное взаимодействие между фитазами и карбогидразами при изучении эффективности использования питательных веществ зависит от типа карбогидраз, концентрации НПС, двухвалентных катионов, содержания нефитатного фосфора в рационе и активности природной фитазы в комбикорме. Названные факторы, как правило, в исследованиях полностью не учитывают. Совместное действие ферментов более выражено на фоне рационов, в которые добавляют смесь карбогидраз, максимально действующую на НПС (Woyengo, Nyachoti, 2011).

Как было указано выше, не всегда испытываемые сочетания ферментов завершаются положительными результатами, хотя априори исследователи рассчитывали на успех. Это вполне естественно для поисковых работ и отражает сложность обоснования перечня необходимых активностей, доз ферментов и, что не менее важно, - обоснования выбора надлежащего состава рациона в качестве фона для испытаний, поскольку выбор ферментов необходимо осуществлять не только с учётом субстратной специфичности, но и доступности субстратов. Последняя изучена слабо и, поэтому её не учитывают. Считают, что при отсутствии результатов, подтверждающих необходимость каждого компонента в составе полиферментного комплекса, нет оснований включать их в состав препарата (Masey O'Neill et al., 2014). Иногда создаётся впечатление, что некоторые полиферментные препараты, которые появляются на рынке, представляют собой случайные или слабо обоснованные смеси, так как не дано описания методов их разработки и отсутствуют результаты подтверждения значимости отдельных ферментов в составе препарата. В таких случаях декларируемая поставщиками эффективность предлагаемых препаратов должна вызывать настороженность у потребителей.

Сравнение действия двух коммерческих полиферментных препаратов: одного, содержащего ксиланазу (2200 ед./г), β -глюканызу (200 ед./г), целлюлазу (100 ед./г), пектиназу (100 ед./г) и другого, содержащего ксиланазу (1800 ед./г), β -глюканызу (2600 ед./г), целлюлазу (500 ед./г) на фоне кукурузно-соевых комбикормов, показало, что они повышали рост цыплят во все периоды выращивания (Goli1, Shahryar, 2015). Увеличение в составе второго препарата по сравнению с первым, концентрации глюканызы в 13 раз и целлюлазы в 5 раз не создало ему существенного преимущества по действию на рост и расход корма на прирост живой массы и даже несколько снизило эти показатели. В данном эксперименте интерес вызывает то, что выраженное позитивное действие добавок ферментов наблюдали на фоне рациона, соответствующего по параметрам питательности рекомендациям поставщика кросса. Тенденция к снижению продуктивности при повышении активности добавляемых ферментов даёт основание предполагать, что могла повыситься глубина расщепления субстратов, которая не оказалась полезной.

Приведенные данные ещё раз подтверждают трудность прогнозирования действия ферментов на продуктивность животных. Изучение влияния ферментов на продуктивность животных в последние годы показывает, что их действие выходит за известное прямое гидролитическое действие (Cowieson, 2005; Yuan et al., 2017). Так установлено, что в присутствии карбогидраз снижалась выработка холецистокинина, который влияет на аппетит, и она возрастала при добавлении протеазы в состав полиферментного комплекса. Экзогенные карбогидразы повышали активность трипсина в поджелудочной железе, но их стимулирующее действие ослабевало в присутствии экзогенной протеазы (Yuan et al., 2017).

Нарушение научно-обоснованных рекомендаций по включению в корм ферментов и их передозировка угнетает секрецию эндогенных ферментов и отрицательно влияет на здоровье животных (Cowieson et al., 2006). В связи с этим положительное действие кормовых ферментов складывается в зависимости от их дозы, специфических свойств и наличия других ферментов, включая эндогенные.

Механизм влияния экзогенных ферментов на реализацию генетической информации не изучен, и не установлены количественные взаимоотношения между дозой ферментов и активностью синтеза специфических белков. Количественный учёт всех влияющих факторов довольно сложен, поэтому к обоснованию применения полиферментных препаратов подходят с

позиций общих знаний их свойств, установленных *in vitro*. В итоге часто приходят к противоречивым выводам при испытании ферментов на животных. Секретция собственных пищеварительных ферментов быстро адаптируется к составу пищи, т.е. она изменчива. Включение в состав корма экзогенных ферментов в известной мере меняет состав химуса и, соответственно, влияет на состав секретируемых ферментов. Это сказывается на суммарной переваримости питательных веществ. Расщепление некрахмальных полисахаридов повышает доступность энергии корма, однако одновременно повышается доступность питательных веществ корма для действия собственных ферментов животного. В результате эффективность применения экзогенных ферментов складывается из их прямого действия и повышения участия эндогенных ферментов в процессах пищеварения. Доля влияния каждого из этих факторов при совместном их действии не изучена и поэтому не известен их количественный вклад в общую переваримость.

Несмотря на множество фитатов, субстратом фитазы является одно соединение - фитиновая кислота, поэтому применение фитазы, проявляющей активность в разных отделах ЖКТ считают более оправданным. Напротив, в связи с огромной вариабельностью свойств веществ, входящих в состав клетчатки и продуктов её первичного гидролиза, предпочтительным является использование многокомпонентных карбогидраз (Ghesquiere, 2021). Учёт опосредованного и не всегда объяснимого действия ферментов, не связанного с расщеплением субстратов, основан на фиксации косвенных показателей. К ним можно отнести изменения морфологии кишечника, состава кишечной микрофлоры и её метаболитов, которые важны для более глубокого понимания факторов, влияющих на продуктивность (Aftab, Bedford, 2018).

Имеются указания на большую выгоду при использовании экзогенных ферментов в рационах цыплят раннего возраста, поскольку их эффективность снижается по мере взросления. Вероятно, что взрослой птице требуются другие дозы ферментов, потому что их физиологические особенности отличаются от таковых у цыплят первых дней жизни; этот аспект требует дальнейшего изучения, чтобы установить практическую пользу таких действий (Olukosi et al., 2007). Возможно, что снижение эффективности добавок экзогенных ферментов у взрослой птицы объясняется тем, что в результате возрастного повышения переваривания питательных веществ собственными ферментами, снижается доля непереваренных субстратов, на которые рассчитано действие экзогенных ферментов. Обобщение ряда исследований позволило прийти к заключению, что включение в рационы, содержащие пшеницу, ячмень и рожь, даёт устойчивые экономические результаты при применении сочетаний нескольких карбогидраз, включая целлюлазы, пектиназы, ксиланазы, глюканазы, маннаназы и галактаназы (Slominski, 2011).

Изучение рынка ферментов показывает, что за последние 15 лет произошли существенные изменения, и среди кормовых ферментов лидируют фитазы, за которыми следуют ксиланазы, а затем с большим отрывом следуют глюканазы. Другие ферменты - протеазы, амилазы и маннаназы, пектиназы занимают небольшую долю рынка кормовых ферментов, в связи с их меньшей востребованностью. В недавних исследованиях фитаза и ксиланаза на фоне рациона с пониженной питательностью обеспечивали повышение прироста живой массы и эффективности использования корма у бройлеров, при этом не выявили разницы по эффективности между фитазой+ксиланазой и фитазой+ксиланазой+протеазой (Walk, Poernama, 2019). Несколько ранее установили, что проявление взаимодействия между ксиланазой и фитазой зависит от состава рациона (Schramm et al., 2017).

Относительно целесообразности включения протеазы в состав полиферментных препаратов нет устоявшегося мнения. На основании метаанализа пришли к выводу, что при включении монокомпонентной протеазы в рационы свиней и птиц повышается переваримость протеина и конверсия корма, Однако когда в рацион одновременно были включены другие ферменты, то положительное действие протеазы не проявлялось (Lee et al., 2018). Разная эффективность экзогенной ксиланазы и протеазы в полиферментных препаратах может зависеть от присутствия в кормах ингибиторов ксиланазы и протеазы (Nørgaard et al., 2019), которые обычно не контролируют. Не регулярное проявление положительного действия протеаз, возможно связано с отсутствием надёжных критериев их выбора. В этом направлении может быть достигнут прогресс при развитии исследований, проведенных в последнее время (Yu et al., 2020).

Процессы пищеварения включают в себя последовательное действие многочисленных эндогенных ферментов по ходу продвижения содержимого в желудочно-кишечном тракте. Согласованное действие эндогенных ферментов сложилось на протяжении эволюции животных, тогда как экзогенные ферменты добавляют в корм в соответствии с теми знаниями, которые существуют в текущее время.

На рынке предлагают десятки полиферментных препаратов с множеством специфических активностей, однако последнее может быть даже вредным. В литературе редко встречаются полиферментные препараты с количеством активностей более четырёх, однако, и в этих случаях подтверждение необходимости каждого фермента не доказано. Чтобы подтвердить эффективность состава полиферментного препарата, включающего четыре фермента - А, Б, Г и Д, которые порознь эффективны, необходимо на одном и том же кормовом фоне испытать действие каждого фермента и их сочетаний. При этом надо обосновать, почему выбраны названные активности, а не другие (например: А, В, С, К). Для обоснования эффективности предлагаемого препарата количество проверяемых вариантов будет следующим: 1 – А, 2 – Б, 3 – Г, 4 – Д; 5 – АБ, 6 – АГ, 7 – АД; 8 – БГ, 9 – БД; 10 – ГД; 11 – АБГ, 12 – АБД; 13 – БГД; 14 – ГДА и 15 – АБГД. Если из 15 вариантов последний окажется самым эффективным, то он будет принят как подходящий вариант, хотя среди испытанных успешным может оказаться препарат, включающий две или три активности. Это большая экспериментальная работа, и если в неё добавить варианты установления оптимальных доз ферментов, то её выполнение в полном объёме становится практически невозможным.

Ферменты добавляют в корма для переваривания той части питательных веществ, которые не перевариваются собственными ферментами. При включении в корм препаратов, содержащих несколько активностей, их результирующее действие ниже, чем сумма действий, установленных для каждого фермента в отдельности (Зиновьев, Крюков, 2021). Каждый последующий фермент действует на оставшуюся неперевавленную часть, первый фермент подвергнет расщеплению наиболее доступную часть веществ, а для второго и последующих ферментов будут оставаться менее доступные уменьшенные доли субстратов. Естественно, что второй фермент не будет ждать, когда завершится действие первого: они действуют одновременно. Как изменится эффективность их действия? В научном плане вопрос пока не получил ответа. Удачно подобранное сочетание ферментов повышает переваримость питательных веществ (Ravindran et al., 2017; Cowieson et al., 2017; Wu et al., 2019). Однако данные по переваримости питательных веществ являются вторичным показателем относительно уровня продуктивности (Bedford, 2008).

Подводя итоги, можно прийти к выводу, что различные экзогенные ферменты, включаемые в состав полиферментных препаратов, могут оказывать положительное влияние на переваривание питательных веществ и проявлять другие полезные свойства, не связанные с их гидролитической активностью. Обобщение многочисленных исследований до настоящего времени не позволило выработать общей методологии создания полиферментных препаратов, в частности, по той причине, что целесообразность их применения в значительной степени определяется содержанием в корме субстратов и доступностью их для действия ферментов, т.е. теми высоко вариабельными факторами, которые в настоящее время изучены недостаточно.

Заключение

Применение ферментных препаратов, обладающих одной целевой активностью, не всегда было успешным, что вначале объясняли предположениями о недостаточном качестве испытываемых продуктов. За последние 10-15 лет созданы высокоактивные ферменты со стабильными заданными свойствами и снижена их стоимость, что позволяет достигать высокой экономической эффективности при удачном их применении. Успехи в создании ферментных препаратов обусловлены широким их применением в различных отраслях промышленности, для обеспечения устойчивого осуществления технологических процессов. В промышленных технологиях не выбирают ферменты, поскольку их дозы и активность однажды установлены и указаны в технологических картах, в которых также предусмотрено использование сырья строго регламентированного состава. Неустойчивость результатов использования этих же ферментов в

кормлении животных обусловлена не качеством ферментов, а доступным уровнем знаний у потребителей, которые не могут чётко обосновать подбор подходящих ферментов с учётом изменчивости субстратного состава кормов и других факторов.

Согласно проведенному метаанализу, положительное влияние добавок экзогенных ферментов на продуктивность животных отмечено немногим более, чем в одной трети случаев, тогда как повышение переваримости питательных веществ, регистрируется в два раза чаще. Это свидетельствует о том, что на основании изучения гидролитического действия ферментов нельзя чётко спрогнозировать продуктивность. В практических условиях контроль результатов и обоснованность использования ферментов ниже, чем в научных исследованиях. Это обусловлено меньшим уровнем знаний у практиков, что снижает успешность применения ферментов. На этом основании можно заключить, что предполагаемая экономическая эффективность от применения ферментов основана больше на ожиданиях, чем на научных обоснованиях.

Общепринятой методологии разработки полиферментных препаратов не существует. На основании вышеизложенного можно сделать важный практический вывод: включение в комбикорма двух-трёх ферментов с различной специфической активностью, с учётом доз, указанных в наставлениях по применению каждого из них в отдельности, не гарантирует ожидаемого повышения продуктивности животных. Наблюдаемое в некоторых случаях улучшение скорости роста молодняка на фоне высокопитательных кормов может быть связано с пребиотическим действием олигосахаридов, образующихся при гидролизе НПС. Включение ферментов в корма с высокой переваримостью часто малоэффективно, потому что их действие нацелено на расщепление непереваримой фракции корма, которая в таких кормах мала. Многочисленные исследования по изучению механизма действия ферментов сопровождаются успехом в условиях *in vitro* на чистых субстратах, для доказательства эффективности созданных препаратов. В кормовом сырье вещества, являющиеся субстратами ферментов, связаны между собой и инкапсулированы стенками клеток растений, что ограничивает их доступность для действия ферментов. Это создаёт трудности в прогнозировании реальной эффективности как моно-, так и полиферментных препаратов. Обобщение многих научных публикаций показывает, что под действием экзогенных ферментов дополнительно может перевариться до 30% непереваримой фракции. Чем выше доля этой фракции в корме, тем более выражена эффективность применения ферментов.

В практических условиях успешными чаще оказываются сочетания ксиланазы и фитазы, которые в некоторых случаях усиливаются добавкой кератиназы и (или) амилазы, реже - другими ферментами. Результаты применения полиферментных препаратов в практических условиях сопровождается большей неустойчивостью получаемых результатов по сравнению с использованием моноферментных препаратов. Принимать решение о приобретении ферментных препаратов необходимо с учётом их термостабильности и устойчивости к эндогенным протеазам, а окончательное решение об использовании полиферментных препаратов следует после испытаний на фоне реального состава комбикормов.

Список литературы

1. Волчок А.А., Короткова О.Г., Кондратьева Е.Г., Крюков В.С., Синецына О.А., Синецын А.П., Шмаков И.А. Активность глюконазы и ксиланаз кормовых ферментных препаратов в ЖКТ птицы. // Птицеводство. 2018. № 4. С. 39–45.
2. Зиновьев С.В., Крюков В.С. О матрицах кормовых ферментных препаратов. // Эффективное Животноводство. 2021. № 3: С. 111–115.
3. Крюков В., Петрушенко Ю., Глебова И., Зиновьев С. О применении фитаз в кормлении животных. // Эффективное животноводство. 2018. № 12. С. 76–80.
4. Крюков В.С., Глебова И.В., Антипов А.А. Оценка действия фитаз в пищеварительном тракте и использование препаратов фитазы в питании животных (обзор). // Проблемы биологии продуктивных животных. 2019. № 2. С. 19–43.
5. Крюков В.С., Глебова И.В., Зиновьев С.В. Переоценка механизма действия фитазы в питании животных. Успехи биологической химии. 2021. № 61. С. 317–346

6. Слепнева Е.В., Хамматова Е.В. Влияние химических реагентов на кератин шерстяных волокон. // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 16. С. 73–75.
7. Adeola O., Cowieson A.J. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non-ruminant animal production. *J. Anim. Sci.* 2011. 89: 3189–3218.
8. Aftab U., Bedford M.R. The use of NSP enzymes in poultry nutrition: myths and realities. *World's Poultry Sci. J.* 2018. 74: 277–286.
9. Akter M., Iji P.A., Graham H. Increasing zinc levels in phytase-supplemented diets improves the performance and nutrient utilization of broiler chickens. *South Afr. J. Anim. Sci.* 2017. 47: 648–660.
10. Aman P., Graham H. Chemical evaluation of polysaccharides in animal feeds. In: *Feedstuff Evaluation*, (Eds: J. Wiseman, D.J.A. Cole). Chapter 9, London, UK. 1990. P: 161–177.
11. Amerah A.M., Romero L.F., Awati A., Ravindran V. Effect of exogenous xylanase, amylase, and protease as single or combined activities on nutrient digestibility and growth performance of broilers fed corn/soy diets. *Poultry Science*. 2017. 96: 807–814.
12. Azad M.A.K., Sarker M., Li T., Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *BioMed Res. Internl.* 2018. 2: 1–8.
13. Baas T.C., Thacker P.A. Impact of pH on dietary enzyme activity and survivability in swine fed β -glucanase supplemented diets. *Canad. J. Anim. Sci.* 1996. 76: 245–252.
14. Babatunde O.O., Cowieson A.J., Wilson J.W., Adeola O. The impact of age and feeding length on phytase efficacy during the starter phase of broiler chickens. *Poultry Science*. 2019. 98: 6742–6750.
15. Baker J.T., Duarte M.E., Holanda D.M., Kim S.W. Friend or foe? Impacts of dietary xylans, xylooligosaccharides, and xylanases on intestinal health and growth performance of monogastric animals. *Animals* (Basel). 2021. 11(3): 609. doi: 10.3390/ani11030609.
16. Bao Y.M., Romero L.F., Cowieson A.J. Functional patterns of exogenous enzymes in different feed ingredients. *World's Poultry Sci. J.* 2013. 69: 759–774.
17. Bedford M.R. The effect of enzymes on digestion. *J. Appl. Poultry Res.* 1999. 5: 370–378.
18. Bedford M.R. Pitfalls in digestibility techniques for evaluation of phytases. *Proc. 13th Worlds Poult. Congr.* 2008. 76–85.
19. Bedford M.R. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: the role of data interpretation. *Brit. Poultry Sci.* 2018. 59: 486–493.
20. Bedford M.R. Future prospects for non-starch polysaccharide degrading enzymes development in monogastric nutrition. In: *(The value of fibre. Engaging the second brain for animal nutrition.* (Gonzalez-Ortiz G., Bedford M.R. et al., Eds). Wageningen Academic Press, 2019. P. 2052–2063.
21. Bedford M.R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition — their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Techn.* 2000. 86: 1–13.
22. Bedford M.R., Cowieson A.J. Matrix values for exogenous enzymes and their application in the real world. *J. Appl. Poultry Res.* 2020. 29:15–22.
23. Bedford M.R., Walk C.L., Masey O'Neill H.V. Assessing measurements in feed enzyme research: Phytase evaluations in broilers. *J. Appl. Poultry Res.* 2016. 25: 305–314.
24. Bello A., Dersjant-Li Y., Korver D R. The efficacy of 2 phytases on inositol phosphate degradation in different segments of the gastrointestinal tract, calcium and phosphorus digestibility, and bone quality of broilers. *Poultry Science*, 2019. 98: 5789–5800.
25. Berghem L.E.R., Pettersson L.G. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. *Eur. J. Biochem.* 1973. 37: 21–30.
26. Biely P., Vrsanska M., Tenkanen M., Kluepfel D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechn.* 1997. 57: 151–166.
27. Blouzard J.-C., Bourgeois C., de Philip P. et al. Enzyme diversity of the cellulolytic system produced by *Clostridium cellulolyticum* explored by two-dimensional analysis: identification of seven genes encoding new dockerin-containing proteins. *J. Bacteriol.* 2007. 189: 2300–2309.
28. Bohacz J., Kornilowicz-Kowalska T., Kitowski I., Ciesielska A. Degradation of chicken feathers by *Aphanascus keratinophilus* and *Chrysosporium tropicum* strains from pellets of predatory birds and its practical aspect. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 2020. 151:104968. DOI:10.1016/j.ibiod.2020.104968
29. Brandelli A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioproc. Technol.* 2008, 1: 105–116.
30. Brandelli A., Daroit D.J., Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechn.* 2010. 85: 1735–1750.
31. Buksa K., Praznik W., Loeppert R., Nowotna A. Characterization of water and alkali extractable arabinoxylan from wheat and rye under standardized conditions. *J. Food Sci. Techn.* 2016. 53:1389–1398.

32. Burton R.A., Fincher G.B. (1,3:1,4)-beta-D-glucans in cell walls of the poaceae, lower plants and fungi: a tale of two linkages. *Molec. Plant.* 2009. 2: 873–882.
33. Cabahung S., Ravindran V., Selle P.H., Bryden W.L. Response of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus contents. I. Effects on bird performance and toe ash. *Brit. Poultry Sci.* 1999. 40: 660–666.
34. Castanon J.I.R., Marquardt R.R. Effect of enzyme addition, autoclave treatment and fermenting on the nutritive value of field beans (*Vicia faba* L.). *Anim. Feed Sci. Techn.* 1989. 26: 71–79.
35. Carr S.N., Alee G.L., Rincker P.J., Fry R.S., Boler D.D. Effects of endo-1,4- β -d-mannanase enzyme (Hemicell HT 1.5) on the growth performance of nursery pigs. *Profes. Anim. Sci.* 2014. 30: 393–399.
36. Chanliaud E., Saulnier L., Thibault J. Alkaline extraction and characterisation of heteroxylans from maize. *J. Cereal Sci.* 1995. 21:195–203.
37. Chen J., Wedekind K., Vazquez-Anon M. Trypsin inhibitor and urease activity of soybean meal products from different countries and impact of trypsin inhibitor on ileal amino digestibility in pigs. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2020. 97(10): 1151–1160.
38. Choct M. The next big steps for feed enzymes. In: *Proceedings of the 21st European Symposium on Poultry Nutrition*. 2017. Salou/Vila-seca, Spain. Wageningen Acad. Publ. P. 108–112.
39. Choct M. Feed non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. *Feed Mill Intern.* 1997. 191(6): 13–26.
40. Choct M. Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World's Poultry Sci. J.* 2006, 62: 5-16.
41. Choct M., Annison G. Anti-nutritive activity of wheat pentosans in poultry diets. *Brit. Poult. Sci.* 1990. 31: 809–819.
42. Choct M., Kocher A., Waters D.L.E., Pettersson D., Ross G. A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. *Bri. J. Nutr.* 2004. 92: 53–61.
43. Clemente A., Jimenez E., Marin-Manzano M.C., Rubio L.A. Active Bowman-Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. *J. Sci. Food Agricult.* 2008. 88: 513–521.
44. Clicker F.H., Follwell E.H. Application of “protozyme” by *Aspergillus Orizae* to poultry feeding. *Poultry Science*. 1925. 5: 241–247.
45. Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. 29: 3–23.
46. Cowieson A.J. Strategic selection of exogenous enzymes for corn/soy-based poultry diets. *Poultry Science*. 2010. 47: 1–7.
47. Cowieson A.J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Anim. Feed Sci. Techn.* 2005. 119: 293–305.
48. Cowieson A.J., Acamovic T., Bedford M.R. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes: a new perspective. *Anim. Feed Sci. Techn.* 2006. 129(1–2): 149–158.
49. Cowieson A.J., Acamovic T., Bedford M.R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 2004. 45: 101–108.
50. Cowieson A.J., Adeola O. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. *Poultry Science*. 2005, 84: 1860–1867.
51. Cowieson A.J., Bedford M.R., Ravindran V. Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. *British Poultry Science*. 2010, 51: 246–257.
52. Cowieson A.J., Bedford M.R. The effect of phytase and carbohydrase on ileal amino acid digestibility in monogastric diets: complimentary mode of action? *World's Poultry Science Journal*, 2009. 65: 609–624.
53. Cowieson A.J., Ravindran V. Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and digestibility of energy, minerals and amino acids. *Brit. Poult. Sci.* 2008, 49: 37–44.
54. Cowieson A.J., Ravindran V. Effect of phytic acid and microbial phytase on the flow and amino acid composition of endogenous protein at the terminal ileum of growing broiler chickens. *Brit. J. Nutr.* 2007. 98: 745–752.
55. Cowieson A.J., Roos F.F. Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. *Anim. Feed Sci. Techn.* 2016. 221: 331–340.
56. Cowieson A.J., Ruckebusch J.P., Sorbara J.O.B., Wilson J.W., Guggenbuhl P., Roos F.F. A systematic review on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. *Anim. Feed Sci. Techn.* 2017. 225: 182–194.
57. Cowieson A.J., Toghyani M., Kheravii S.K., Wu S.-B., Romero L.F., Choct M. A mono-component microbial protease improves performance, net energy, and digestibility of amino acids and starch, and up-regulates jejuna expression of genes responsible for peptide transport in broilers fed corn/wheat-based diets supplemented with xylanase and phytase. *Poult. Sci.* 2019. 98: 1321–1332.

58. Cozannet P., Neto R.M., Geraert P.-A., Kidd M. Feedase: the new generation of feed enzymes to optimise complete nutrient availability in diets: feed science. *AFMA Matrix*, 2017. 26(1): 24–25.
59. De La Mare M., Guais O., Bonnin E., Weber J., Francois J.M. Molecular and biochemical characterization of three GH62 a-l-arabinofuranosidases from the soil deuteromycete *Penicillium funiculosum*. *Enzym. Microb. Technol.* 2013. 53(5): 351e358.
60. De Oliveira Martinez J.P., Cai G., Nachtschatt M. et al. Opportunities in identifying and characterising keratinases for value-added peptide production. *Catalysts*. 2020. 10: 184–209.
61. Debyser W., Peumans W., van Damme E., Delcour J. Triticum aestivum Xylanase Inhibitor (TAXI), a new class of enzyme inhibitor affecting breadmaking performance. *J. Cereal Sci.* 1999, 30: 39–43.
62. Ebringerová A., Heinze T. Xylan and xylan derivatives — biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylan structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* 2000. 21: 542–556.
63. Elkhailil E.A.I., Männer K., Borriss R., Simon O. In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens. *Brit. Poultry Sci.* 2007. 48: 64–70.
64. Fernandez F., Sharma R., Hilton M., Bedford M.R. Diet influences the colonization of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell Molec. Life Sci.* 2000. 57: 1793–1801.
65. Fontes C.M.G.A., Gilbert H. J. Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Ann. Rev. Biochem.* 2010. 79: 655–681.
66. Francesch M., Pérez-Vendrell A.M., Broz J. Effects of a mono-component endo-xylanase supplementation on the nutritive value of wheat-based broiler diets. *Brit. Poultry Sci.* 2012. 53(6): 809–816.
67. Fry R.E., Allred J.B., Jensen L.S., McGinnis J. Influence of cereal grain components of the diet on the response of chicks and poults to dietary enzyme supplements. *Poultry Science*. 1957. 36: 1120.
68. Gao F., Jiang Y., Zhou G.H., Han Z.K. The effects of xylanase supplementation on performance, characteristics of the gastrointestinal tract, blood parameters and gut microflora in broilers fed on wheat-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2008. 142: 173–184.
69. Gao X., Yu B., Yu J., Mao X., Huang Z., Luo Y., Luo J., Zheng P., He J., Chen D. Effects of dietary starch structure on growth performance, serum glucose–insulin response, and intestinal health in weaned piglets. *Animals*. 2020. 10(3): 543. <https://doi.org/10.3390/ani1003054>
70. Fukushima D. Soy proteins. In: *Handbook of Food Proteins* (Eds: Phillips G. Williams P). Woodhead Publ., 2011. 464 p.
71. Gebruers K., Dornez E., Bedő Z., Rakszegi M., Courtin C.M., Delcour J.A., Rakszegi M. Variability in xylanase and xylanase inhibition activities in different cereals in the HEALTHGRAIN Diversity Screen and contribution of environment and genotype to this variability in common wheat. *J. Agric. Food Chem.* 2010. 58: 9362–9371.
72. Ghesquiere H. Dietary fibre pleads for multi-component enzyme products. Published on: 2/2/2021. <<https://en.engormix.com/poultry-industry/articles/dietary-fibre-pleads-multit46625.htm>>
73. Goesaert H., Debyser W., Gebruers K., Proost P., van Damme J., Delcour J.A. Purification and partial characterization of an endoxylanase inhibitor from barley. *Cereal Chem. J.* 2001, 78: 453–457.
74. Goesaert H., Gebruers K., Courtin C., Proost P., van Damme J., Delcour J. A family of ‘TAXI’-like endoxylanase inhibitors in rye. *J. Cereal Sci.* 2002. 36: 177–185.
75. Goli S., Shahryar H.A. Effect of enzymes supplementation (rovabio and kemin) on some blood biochemical parameters, performance and carcass characterizes in broiler chickens. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 2015. 1(5): 127–131.
76. Gomes J.E.G., da Silva Nascimento T.C.E., de França Queiroz A.E.S. et al. Production, characterization and evaluation of in vitro digestion of phytases, xylanases and cellulases for feed industry. *Afric. J. Microb. Res.* 2014. 8: 551–558.
77. Gracia M.I., Aranibar M.J., Lázaro R., Medel P., Mateos G.G. Alfa-amylase supplementation of broiler diets based on corn. *Poultry Science*. 2003. 82: 436–442.
78. Gutierrez N.A., Kerr B.J., Patience J.F. Effect of insoluble-low fermentable fiber from corn-ethanol distillation origin on energy, fiber, and amino acid digestibility, hindgut degradability of fiber, and growth performance of pigs. *J. Anim. Sci.* 2013. 91: 5314–5325.
79. Gradišar H., Friedrich J., Krizaj I., Jerala R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces* microspores to some known proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. 71: 3420–3426.
80. Hastings W.H. Enzyme supplements for poultry feeds. *Poultry Science*. 1946. 25: 584–586.
81. Hessing G.C., van Laarhoven H., Rooke J.A., Morgan A. Quality of soyabean meals (SBM) and effect of microbial enzymes in degrading soya antinutritional compounds (ANC). In: *2nd International Soyabean Processing and Utilization Conference*. 1996. Bangkok, Thailand. P. 8–13.

82. Huntley N.F., Nyachoti C.M., Patience J.F. Lipopolysaccharide immune stimulation but not β -mannanase supplementation affects maintenance energy requirements in young weaned pigs. *J. Anim. Sci. Biotechn.* 2018. 9: 47–63.
83. Ichikawa Sh., Ogawa S., Nishida A., Kobayashi Y., Kurosawa T., Karita Sh. Cellulosomes localise on the surface of membrane vesicles from the cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*. *FEMS Microb. Lett.* 2019. 366(12): fnz145.
84. Jang J.-C., Kim K.H., Jang Y.D., Kim Y.Y. Effects of dietary β -mannanase supplementation on growth performance, apparent total tract digestibility, intestinal integrity, and immune responses in weaning pigs. *Animals*. 2020. 10: 703.
85. Jeremic D., Goacher R.E., Yan R., Karunakaran C., Master E.R. Direct and up-close views of plant cell walls show a leading role for lignin-modifying enzymes on ensuing xylanases. *Biotechn. Biofuels*. 2014. 7: article 496. doi: 10.1186/s13068-014-0176-9
86. Jiang Z., Zhou Y., Lu F., Han Z, Wang T. Effects of different levels of supplementary alpha amylase on digestive enzyme activities and pancreatic amylase mRNA expression of young broilers. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 2008. 21: 97–102.
87. Juanpere J., Pe'rez-Vendrell A. M., Angulo E., Brufau J. Assessment of potential interactions between phytase and glycosidase enzyme supplementation on nutrient digestibility in broilers. *Poultry Science*. 2005. 84: 571–580.
88. Kaczmarek S.A., Rogiewicz A., Mogielnicka M., Rutkowski A., Jones R.O., Slominski B.A. The effect of protease, amylase, and nonstarch polysaccharide-degrading enzyme supplementation on nutrient utilization and growth performance of broiler chickens fed corn-soybean meal-based diets. *Poultry Science*. 2014. 93: 1745–1753.
89. Kocher A., Hower J.M., Moran C.A. A dual-enzyme product containing protease in broiler diet: efficacy and tolerance. *J. Appl. Anim. Nutr.* 2015. Vol. 3. e6. <<https://doi.org/10.1017/jan.2015.4>>
90. Kolpak F.J., Blackwell J. Determination of the structure of cellulose II. *Macromolecules*. 1976, 9: 273–278.
91. Knudsen K.E.B. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science*. 2014. 93 2380–2393.
92. Kryukov V.S., Glebova I.V., Zinoviev S.V. Monitoring the activity of feed enzymes in vitro and their activity in the system that modulates the gut. *Ecol. Evolut. Biol.* 2019. 4(3): 33–38.
93. Kusakabe I.; Takahashi R. Enzymatic preparation of β -1,4-mannooligosaccharides and β -1,4-glucomannooligosaccharides. *Methods Enzymol.* 1988. 160: 518–523.
94. Lærke H. N., Arent S., Dalsgaard S., Bach Knudsen K.E. Effect of xylanases on ileal viscosity, intestinal fiber modification, and apparent ileal fiber and nutrient digestibility of rye and wheat in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 2015. 93: 4323–4335.
95. Leske K.L, Coon C.N. Bioassay to determine the effect of phytase on phytate phosphorus hydrolysis and total phosphorus retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. *Poultry Science*. 1999. 78: 1151–115.
96. Lee K.W., Choi Y.I., Moon E.J., Oh S.T., Lee H.H., Kang C.W., An B.K. Evaluation of dietary multiple enzyme preparation (natuzyme) in laying hens. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 2014. 27(12): 1749–1754.
97. Lee S.A., Wiseman J., Masey O'Neill H.V., Scholey D. Understanding the direct and indirect mechanisms of xylanase action on starch digestion in broilers. *J. World's Poultry Res.* 2017. 7(2): 35–47.
98. Lee S.A., Bedford M.R., Walk C.L. Meta-analysis: Explicit value of mono-component proteases in monogastric diets. *Poultry Science*. 2018. 97: 2078–2085.
99. Len N.T., Ngoc T B., Ogle B., Lindberg J.E. Ileal and total tract digestibility in local (Mong Cai) and exotic (Landrace x Yorkshire) piglets fed low and high-fibre diets, with or without enzyme supplementation. *Livest. Sci.* 2009 126: 73–79.
100. Leske K.L, Coon C.N. Bioassay to determine the effect of phytase on phytate phosphorus hydrolysis and total phosphorus retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. *Poultry Sci.* 1999. 78: 1151–1157.
101. Lewis C.J., Catron D.V., Liu C.H., Speer V.C., Ashton G.C. Enzyme supplementation of baby pig diets. *Agric. Food Chem.* 1955. 3: 1047–1050.
102. Lin J. S., Tang M.-Y., Fellers J.F. Fractal analysis of cotton cellulose as characterized by small-angle X-ray scattering. *ACS Symp.* 1987. Ser. 340: 233–254.
103. Lin X., Lee C.-G., Casale E.S., Shih J.C. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. 58: 3271–3275.
104. Lin X., Shih J.C.H., Swaisgood H.E. Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. 62: 4273–4275.
105. Lindberg J.E. Fiber effects in nutrition and gut health in pigs. *J. Anim. Sci. Biotechn.* 2014. 5. Article nr 15.

106. Liu, J.; Cao, S.C.; Xie, Y.N.; Zhang, H.F. Effect of probiotics and xylo-oligosaccharide supplementation on nutrient digestibility, intestinal health and noxious gas emission in weanling pigs. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 2018. 31: 1660–1669.
107. Liu N., Ru Y.J., Cowieson A.J., Li F.D., Cheng C.H. Effects of phytate and phytase on the performance and immune function of broilers fed nutritionally marginal diets. *Poultry Science*, 2008. 87: 1105–1111.
108. Liu W.Ch., Kim I.H. Effects of dietary xylanase supplementation on performance and functional digestive parameters in broilers fed wheat-based diets. *Poultry Science*. 2017. 96: 566–573.
109. López-Otín C., Bond J.S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* 2008. 283: 30433–30437.
110. Lu P.Y., Wang J., Wu S.G., Gao J., Dong Y., Zhang H.J., Qi G.H. Standardized ileal digestible amino acid and metabolizable energy content of wheat from different origins and the effect of exogenous xylanase on their determination in broilers. *Poultry Science*. 2020. 99: 92–100.
111. Ma J., Yang T., Yang M. et al. Effects of dietary amylose/amylopectin ratio and amylase on growth performance, energy and starch digestibility, and digestive enzymes in broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berlin)*. 2020. 104: 928–935.
112. Madhukumar M.S.; Muralikrishna G. Fermentation of xylo-oligosaccharides obtained from wheat bran and Bengal gram husk by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Food Sci. Technol.* 2011. 49: 745–752.
113. Mahagna M., Nir I., Lorbier M., Nitsan Z. Effect of age and exogenous amylase and protease on development of the digestive tract, pancreatic enzyme activities and digestibility of nutrients in young meat-type chicks. *Repr. Nutr. Develop.* 1995. 35: 201–212.
114. Masey O'Neill H.V., Smith J.A., Bedford M.R. Multicarbohydrase enzymes for non-ruminants. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 2014. 27: 290–301.
115. McNeill M., Darvill A.G., Fry S.C., Albersheim P. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann. Rev. Biochem.* 1984. 53: 625–663.
116. Meng X., Slominski B., Nyachoti A., Campbell C.M., Guenter L.D. Degradation of cell wall polysaccharides by combinations of carbohydrase enzymes and their effect on nutrient utilization and broiler chicken performance. *Poultry Science*. 2005. 84: 37–47.
117. Menezes-Blackburn D., Gabler S., Greiner R. Performance of seven commercial phytases in an in vitro simulation of poultry digestive tract. *J. Agric. Food Chem.* 2015. 63(27): 6142–6149.
118. Miura E.M.Y., Ferreira Da Silva R.S.D.S., Mizubuti I.Y., Ida, E.I. Cinética de inativação de inibidores de tripsina e de insolubilização de proteínas de diferentes cultivares de soja. *Rev. Brasil. Zootec.* 2005. 34: 1659–1665.
119. Mohiti-Asli M., Ghanaatparast-Rashti M., Akbarian P., Mousavi S. N. Effects of a combination of phytase and multi-carbohydrase enzymes in low-density corn–soybean meal based diets on growth performance and ileal nutrients digestibility of male broilers. *Ital. J. Anim. Sci.* 2020. 19: 1533–1541.
120. Morana A., Maurelli L., Ionata E., La Cara F., Rossi M. Cellulases from fungi and bacteria and their biotechnological applications. In: *Cellulase: types and action, mechanisms and uses*. Nova Sci. Publ. New York (US). 2011. P. 1–79.
121. Moreno F.J., Clemente A. 2S albumin storage proteins: what makes them food allergens? *Open Biochem. J.* 2008. 2: 11–23.
122. Moss A., Chrystal P., Dersjant-Li, Y., Liu S., Selle P. The ranked importance of dietary factors influencing the performance of broiler chickens offered phytase-supplemented diets by the Plackett-Burman screening design. *Brit. Poultry Sci.* 2019. 60: 439–448.
123. Murashima K., Kosugi A., Doi R.H. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from clostridium cellulovorans on plant cell wall degradation. *J. Bacteriol.* 2003. 185: 1518–1524.
124. Mynott T.L., Luke R.K., Chandler D.S. Oral administration of protease inhibits enterotoxigenic Escherichia coli receptor activity in piglet small intestine. *Gut*. 1996. 38: 28–32.
125. Nahm K.H., Carlson C.W. Effects of cellulase from trichoderma viride on nutrient utilization by broilers. *Poultry Science*. 1985. 64: 1536–1540.
126. Navone L., Speight R. Understanding the dynamics of keratin weakening and hydrolysis by proteases. *PLoS One*. 2018. 13: 1–21.
127. Ndou S.P., Kiarie E., Agyekum A.K., Heo J.M. et al. Comparative efficacy of xylanases on growth performance and digestibility in growing pigs fed wheat and wheat bran-or corn and corn DDGS-based diets supplemented with phytase. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2015. 209: 230–239.
128. Noy Y., Sklan D. Digestion and absorption in the young chick. *Poultry Science*. 1995. 74: 366–373
129. Nørgaard J.V., Malla N., Dionisio G. et al. Exogenous xylanase or protease for pigs fed barley cultivars with high or low enzyme inhibitors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2019. 248: 59–66.

130. Odetallah N.H., Wang J.J., Garlich J.D., Shih J.C.H. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. *Poultry Science*. 2003. 82: 664–670.
131. Olukosi O.A., Adeola O. Whole body nutrient accretion, growth performance and total tract nutrient retention responses of broilers to supplementation of xylanase and phytase individually or in combination in wheat-soyabean meal based diets. *Poultry Science*. 2008. 45: 192–198.
132. Olukosi O.A., Bedford M.R. Comparative effects of wheat varieties and xylanase supplementation on growth performance, nutrient utilization, net energy, and whole-body energy and nutrient partitioning in broilers at different ages. *Poultry Science*. 2019. 98: 2179–2188.
133. Olukosi O.A., Cowieson A.J., Adeola O. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. *Poultry Science*. 2007. 86: 77–86.
134. Onyango E.M., Bedford M.R., Adeola O. Phytase activity along the digestive tract of the broiler chick: A comparative study of an *Escherichia coli*-derived and *Peniophora lycii* phytase. *Canad. J. Anim. Sci.*. 2005, 85: 61–68.
135. Paës G., Berrin J.-G., Beaugrand J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. *Biotechn. Adv.* 2012. 30: 564–592.
136. Parker K.N., Chhabra S.R., Lam D. Galactomannanases Man2 and Man5 from *Thermotoga* species: growth physiology on galactomannans, gene sequence analysis, and biochemical properties of recombinant enzymes. *Biotechn. Bioengin.* 2001. 75: 322–333.
137. Penha L.A.O., Fonseca I.C.B., Mandarino J.M., Benassi V.T. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. *Bolet. Centro Pesq. Proces. Alim.* 2007. 25: 91–102.
138. Petry A.L., Patience J.F., Huntley N.F. et al. Xylanase supplementation modulates the microbiota of the large intestine of pigs fed corn-based fiber by means of a stimbiotic mechanism of action. *Front. Microbiol.* 2021. 24 March. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.619970>>
139. Petry A.L., Patience J.F. Xylanase supplementation in corn-based swine diets: a review with emphasis on potential mechanisms of action. *J. Anim. Sci.* 2020. 98(11): 1–12.
140. Qiu J., Wilkens C., Barrett K., Meyer A. S. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function. *Biotechn. Adv.* 2020. 44: 1–22.
141. Ravindran V. Feed enzymes: the science, practice, and metabolic realities. *J. Appl. Poultry Res.* 2013. 22: 628–636.
142. Ravindran V., Selle P.H., Bryden W.L. Effects of phytase supplementation, individually and in combination, with glycanase, on the nutritive value of wheat and barley. *Poultry Science*. 1999. 83: 1588–1595.
143. Ravindran V., Morel P.C., Partridge G.G., Hruby M., Sands J.S. Influence of an *Escherichia coli*-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. *Poultry Science*. 2006.85: 82–89.
144. Ravindran V., Adeola O., Rodehutsord M. et al. Determination of ileal digestibility of amino acids in raw materials for broiler chickens - results of collaborative studies and assay recommendations. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2017. 225: 62–72.
145. Rehman Z.U., Aziz T., Bhatti S.A. et al. Effect of β -mannanase on the Performance and Digestibility of Broilers. *Asian J. Anim. Veter. Adv.* 2016. 11: 393–398.
146. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microb. Molec. Biol. Rev.* 1998. 62: 597–635.
147. Razzaq A., Shamsi S., Ali A., Ali Q., Sajjad M., Malik A., Ashraf M. Microbial proteases applications. *Front. Bioeng. Biotechn.* 2019, 12(7): Articl No 10. P. 1–20.
148. Rehman Z.U., Aziz T., Bhatti S.A. et al. Effect of β -mannanase on the performance and digestibility of broilers. *Asian J. Anim. Veter. Adv.* 2016. 11: 393–398.
149. Romero L.F., Parsons C.M., Utterback P.L., Plumstead P.W., Ravindran V. Comparative effects of dietary carbohydrases without or with protease on the ileal digestibility of energy and amino acids and AMEn in young broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2013. 181: 35–44.
150. Roofchaei A. Rezaeipour V., Vatandour S., Zaefarian F. Influence of dietary carbohydrases, individually or in combination with phytase or an acidifier, on performance, gut morphology and microbial population in broiler chickens fed a wheat-based diet. *Anim. Nutr.* 2019. 5: 63–67.
151. Ryu D.D., Mandels M. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enz. Microb. Technol.* 1980. 2: 91–102.
152. Sancho A.I., Faulds C.B., Svensson B., Bartolomé B., Williamson G., Juge N. Cross-inhibitory activity of cereal protein inhibitors against α -amylases and xylanases. *Biochim. Biophys. Acta. Prot. Proteom.* 2003. 1650: 136–144.
153. Saulnier L., Guillon F., Chateigner-Boutin A.-L. Cell wall deposition and metabolism in wheat grain. *J. Cereal Sci.* 2012. 56: 91–108.

154. Schutte J. B. de Jong J., Polziehn R., Verstegen W.A. Nutritional implications of D-xylose in pig. *Brit. J. Nutr.* 1991, 66:83–93.
155. Schramm V.G., Durau J.F., Barrilli L.N.E. et al. Interaction between xylanase and phytase on the digestibility of corn and a corn/soy diet for broiler chickens. *Poultry Science*, 2017. 96: 1204–1211.
156. Selle P.H., Ravindran V., Ravindran G., Pittolo P.H., Bryden W.L. Influence of phytase and xylanase supplementation on growth performance and nutrient utilisation of broilers offered wheat-based diets. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 2003. 16: 394-402.
157. Selle P.H., Ravindran V., Partridge G.G. Beneficial effects of xylanase and/or phytase inclusions on ileal amino acid digestibility, energy utilisation, mineral retention and growth performance in wheat-based broiler diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2009. 153: 303–313.
158. Shimada M., Mochizuki K., Goda T. Feeding rats dietary resistant starch shifts the peak of SGLT1 gene expression and histone H³ acetylation on the gene from the upper jejunum toward the ileum. *J. Agr. Food Chem.* 2009. 57: 8049–8055.
159. Siegert W., Zuber T., Sommerfeld V., Krieg J., Feuerstein D., Kurrle U., Rodehutsord M. Prececal amino acid digestibility and phytate degradation in broiler chickens when using different oilseed meals, phytase and protease supplements in the feed. *Poultry Science*. 2019. 98: 5700–5713.
160. Simon O. and Igbasan F. In vitro properties of phytases from various microbial origins. *Intern. J. Food Sci. Technol.* 2002. 37: 813–822.
161. Singh R., Mittal A., Kumar M., Mehta P.K. Microbial *Proteases in Commercial Applications. J. Pharmc. Chem. Biol. Sci.* 2016. 4: 365–374.
162. Slominski B.A. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science*. 2011. 90: 2013–2023.
163. Schramm V.G., Durau J.F., Barrilli L.N.E. et al. Interaction between xylanase and phytase on the digestibility of corn and a corn/soy diet for broiler chickens. *Poultry Science*. 2017. 96: 1204–1210.
164. Stefanello C., Vieira S. L., Santiago G.O. et al. Starch digestibility, energy utilization, and growth performance of broilers fed corn-soybean basal diets supplemented with enzymes. *Poultry Science*. 2015. 94: 2472–2479.
165. Stein H.H., Connot S.P., Pedersen C. Energy and nutrient digestibility in four sources of distillers dried grains with solubles produced from corn grown within a narrow geographical area and fed to growing pigs. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 2009. 22(7): 1016–1025.
166. Suzuki Y., Tsujimoto Y., Matsui H., Watanabe K. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 2006. 102: 73–81.
167. Tang D., Hao S., Liu G., Nian F., Ru Y. Effects of maize source and complex enzymes on performance and nutrient utilization of broiler. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 2014. 27: 1755–1762.
168. Tejedor A.A., Albino L.F.T., Rostagno H.S., Lima C.A.R., Vieites F.M. Effect of enzymes supplementation in corn soybean meal broiler diets on ileal digestibility of nutrients. *Rev. Bras. Zootec.* 2001. 30: 809–816.
169. Theander O., Westerlund E., Aman P., Graham H. Plant cell walls and monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1989. 23: 205–225.
170. Torres-Pitarch A., Manzanilla E.G., Gardiner G.E., O’Doherty J.V., Lawlor P.G. Systematic review and meta-analysis of the effect of feed enzymes on growth and nutrient digestibility in grow-finisher pigs: Effect of enzyme type and cereal source. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2019, 251: 153–165.
171. Vasquez M.V., Glitsoe V. Phytase unit myth! 2012.
<https://www.dsm.com/content/dam/dsm/anh/en_US/documents/2012_Phytase_unit_myths.pdf>
172. Vieira S.L., Stefanello C., Sorbara J.O.B. Formulating poultry diets based on their indigestible components. *Poultry Science*. 2014. 93: 2411–2416.
173. de Vries R. P., Visser J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. 65: 497–522.
174. Walk C.L., Poernama F. Evaluation of phytase, xylanase, and protease in reduced nutrient diets fed to broilers. *J. Appl. Poultry Res.* 2019. 28: 85–93.
175. Walk C.L., Pirgozliev V., Juntunen K., Paloheimo M., Ledoux D.R. Evaluation of novel protease enzymes on growth performance and apparent ileal digestibility of amino acids in poultry: enzyme screening. *Poultry Science*. 2018. 97: 2123–2138.
176. Walk C.L., Olukosi O.A. Influence of graded concentrations of phytase in high-phytate diets on growth performance, apparent ileal amino acid digestibility, and phytate concentration in broilers from hatch to 28 D post-hatch. *Poultry Science*. 2019. 98: 3884–3893.
177. Ward N.E. Choosing enzyme solution depends on many factors. *Feedstuffs*. 2014. 86. No. 04, January 27.
178. Wang D., Piao X.S., Zeng Z.K, et al. Effects of keratinase on performance, nutrient utilization, intestinal morphology, intestinal ecology and inflammatory response of weaned piglets fed diets with different levels of crude protein. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 2011. 24: 1718–1728.

179. Wang J.J., Garlich J.D., Shih J.C.H. Beneficial effects of versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens. *J. Appl. Poultry Res.* 2006. 15: 544–550.
180. Wealleans A.L., Walsh M.C., Romero L.F., Ravindran V. Comparative effects of two multi-enzyme combinations and a Bacillus probiotic on growth performance, digestibility of energy and nutrients, disappearance of non-starch polysaccharides, and gut microflora in broiler chickens. *Poultry Science.* 2017. 96: 4287–4297.
181. Wilkie K.C.B., Woo S.L. A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. *Carbohydr. Res.* 1977. 57: 145–162
182. Willamil J., Badiola I., Devillard E., Geraert P.A., Torrallardona D. Wheat-barley-rye- or corn-fed growing pigs respond differently to dietary supplementation with a carbohydrase complex. *J. Anim. Sci.* 2012, 90: 824–832.
183. Williams M.P., Masey O'Neill H.V, York T., Lee J.T. Effects of nutrient variability in corn and xylanase inclusion on broiler performance, nutrient utilization, and volatile fatty acid profiles. *J. Appl. Anim. Nutr.* 2018. 6(e1): 1–10.
184. Wood T.M., McCrae S.I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Adv. Chem. Ser.* 1979. 181: 181–209.
185. Woyengo T.A., Guenter W., Sands J.S., Nyachoti C.M., Mirza M.A. Nutrient utilisation and performance responses of broilers fed a wheat-based diet supplemented with phytase and xylanase alone or in combination. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2008. 146: 113–123.
186. Woyengo T.A., Slominski B.A. and Jones R.O. Growth performance and nutrient utilization of broiler chickens fed diets supplemented with phytase alone or in combination with citric acid and multicarbohydrase. *Poultry Science.* 2010. 89: 2221–2229.
187. Woyengo T.A., Nyachoti C.M. Review: Supplementation of phytase and carbohydrases to diets for poultry. *Canad. J. Anim. Sci.* 2011. 91: 177–192.
188. Wu S. B., Choct M., Pesti G. Historical flaws in bioassays used to generate metabolizable energy values for poultry feed formulation: a critical review. *Poultry Science.* 2019. 98: 7173.
189. Wu Y.B., Ravindran V., Thomas D.G., Birtles M.J., Hendriks W. . Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *Brit. Poultry Sci.* 2004. 45: 76–84.
190. Yamamoto K., Tamaru Y. Synergistic properties of cellulases from Clostridium cellulovorans in the presence of cellobiose. *AMB Express.* 2016. 6(1):1–6.
191. Yamazaki M., Murakami H., Nakashima K., Otsuka M., Takada R., Abe H. Effect of cellulase supplementation in low-crude protein diets on performance, nitrogen excretion, fat deposition, hepatic lipogenic and lipolytic enzyme activity in broilers. *Brit. Poultry Sci.* 2007. 48: 210–216.
192. Yegani M., Korver D.R. Effects of corn source and exogenous enzymes on growth performance and nutrient digestibility in broiler chickens. *Poultry Sci.* 2013. 92: 1208–1220.
193. Yi J. Q., Piao X.S., Li Z.C., Zhang H.Y. et al. The effects of enzyme complex on performance, intestinal health and nutrient digestibility of weaned pigs. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 2013. 26: 1181–1188.
194. Yu S., Thøgersen J.B., Kragh K.M. Comparative study of protease hydrolysis reaction demonstrating normalized peptide bond cleavage frequency and protease substrate broadness index. *Plos One.* 2020. September. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239080>>
195. Yuan J., Wang X., Yin D., Wang M., Yin X., Lei Z, Guo Y. Effect of different amylases on the utilization of corn starch in broiler chickens. *Poultry Science.* 2017. 96: 1139–1148.
196. Yuan L., Wang M., Zhang X., Wang Z. Effects of protease and non-starch polysaccharide enzyme on performance, digestive function, activity and gene expression of endogenous enzyme of broilers. *PLoS One.* 2017. 12: e0173941.
197. Yoo J.S., Jang H.D., Lee J.H., Kim I.H. Effect of fermented soy bean protein on nitrogen balance and apparent fecal and ileal digestibility in weaned pigs. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 2009. 22: 1167–1173.
198. Zeller E., Schollenberger M., Kühn I., Rodehutschord M. Hydrolysis of phytate and formation of inositol phosphate isomers without or with supplemented phytases in different segments of the digestive tract of broilers. *J. Nutr. Sci.* 2015. 4: 1–12.
199. Zhang J., Gao Y., Lu Q., Sa R., Zhang H. Proteome changes in the small intestinal mucosa of growing pigs with dietary supplementation of non-starch polysaccharide enzymes. *Proteome Science.* 2017. 15: 3, 1–14.
200. Zuo J., Ling B., Long L., Li T., Lahaye L., Yang C., Feng D. Effect of dietary supplementation with protease on the growth performance, nutrient utilization, intestinal morphology, digestive enzymes and gene expression of weaned piglets. *Anim. Nutr.* 2015. 1: 276–282.

201. Zou X.T., Qiao X.J., Xu Z.R. Effect of β -Mannanase (Hemicell) on growth performance and immunity of broilers. *Poultry Science*. 2006. 85: 2176–2179.
202. Żyła K., Mika M., Stodolak B., Wikiera A., Koreleski J., Świątkiewicz S. Towards complete dephosphorylation and total conversion of phytases in poultry feeds. *Poultry Science*, 2004. 83: 1175–1186.
203. Żyła K., Duliński R., Pierzchalska M., Grabacka M., Józefiak D., Świątkiewicz S. Phytases and myo-inositol modulate performance, bone mineralization and alter lipid fractions in the serum of broilers. *J. Anim. Feed Sci.* 2013. 22: 56–62

References (for publications in Russia)

1. Volchok A.A., Korotkova O.G., Kondrat'eva E.G., Kryukov V.S., Sinitsyna O.A., Sinitsyn A.P., Shmakov I.A. [Activity of glucanases and xylanases of fodder enzyme preparations in the digestive tract of poultry]. *Prıtsevodstvo – Poultry Science*. 2018. 4: 39-45.
2. Zinov'ev S.V., Kryukov V.S. [On matrices of feed enzyme preparations]. *Effektivnoe Zhivotnovodstvo -Effective Livestock*. 2021, 3: 111-115.
3. Kryukov V., Petrushenko Yu., Glebova I., Zinov'ev S. [On the use of phytases in animal feeding]. *Effektivnoe Zhivotnovodstvo - Effective Livestock*. 2018. 12: 76-80.
4. Kryukov V.S., Glebova I.V., Antipov A.A. [Evaluation of the action of phytases in the digestive tract and the use of phytase preparations in animal nutrition: a review]. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of productive animal biology*. 2019. 2: 19-43.
5. Kryukov V.S., Glebova I.V., Zinov'ev S.V. [Reassessment of the mechanism of action of phytase in animal nutrition]. *Uspekhi biologicheskoi khimii - Advances in biological chemistry*. 2021. 61: 317-346.
6. Slepneva E.V. Khammatova V.V. [The effect of chemical reagents on the keratin of wool fibers. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta - Bulletin of Kazan Technological University*. 2014. 17(16.): 73-75.

DOI: 636.4.5:636.085:577.15

Problems of the methodology for the construction of polyenzyme preparations and increasing the effectiveness of their use in animal husbandry

¹Kryukov V.S., ²Zinoviev S.V., ³Kryukov O.V.

¹ООО "Kormogran", Moscow; ²Poultry Processing Institute, Rzhavki, Moscow oblast; ³Kemin Industries LLC, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT. In recent years, progress in the field of microbiology and genetic engineering has created the prerequisites for the creation of a wide range of enzyme preparations (EP) for use in animal husbandry. The prospects of this direction are undeniable, however, on the way to obtaining highly active preparations with desired properties, a number of methodological problems arise. The main problem is that, based on the results of *in vitro* studies of exogenous enzymes, it is difficult to predict the effectiveness of their action in the animal body. There is reason to believe that this is due to the lack of available data on the composition and concentration of substrates in macromolecular complexes of the contents of the intestinal tract. The validity of this assumption is argued in the review when considering the features of the action of various EPs and their influence on the efficiency of the use of feed nutrients in monogastric animals (pigs, broilers). The main sections of the review: factors influencing the action of carbohydrases; mannanases and amylases in animal feeding; cellulases, phytases, proteases, polyenzyme preparations; the effect of the composition of polyenzyme preparations on productivity. Exogenous enzymes consumed with food interfere with the evolutionary natural digestive system and are not subject to biological regulation in the gastrointestinal tract. Under the influence of exogenous enzymes, the secretion of digestive enzymes and the intestinal microbiome changes, which affects the body's immune system. The mechanisms of interaction between exogenous and endogenous enzymes have been insufficiently studied. By analogy with the composition of natural enzymes, attempts are being made to create polyenzyme mixtures of exogenous enzymes; however, it is even more difficult to predict their effect in the body of animals in comparison with monoenzyme preparations. The instability of the results of using EP in animal feeding is mainly due to the level of knowledge among developers and consumers, which is insufficient for adequate selection of enzymes, taking into account the variability of the substrate composition of feed. Therefore, it is currently advisable to make a decision on the production and use of enzyme preparations after testing against the background of the real composition of the feed.

Keywords: poultry, pigs, enzymes feed additives, carbohydrases, protease, phytase, polyenzyme additives

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology. 2021. 4: 5-39

Поступило в редакцию: 16.11.2021

Получено после доработки: 20.12.2021

Сведения об авторах:

Крюков Валерий Сергеевич, д.б.н., проф., тел. +7(966)377-74-68; kryukov.v.s@mail.ru

Зиновьев Сергей Владимирович, к.с.-х.н., тел. +7(920)733-46-13; neollit_13@mail.ru

Крюков Олег Валерьевич, к.с.-х.н., тел. +7(916)394-67-42; oleg.krukov@mail.ru