

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ**

ТРУДЫ

**ВСЕРОССИЙСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА
ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

Том XLI

Боровск, 2002

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

**ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ
ЖИВОТНЫХ**

ТРУДЫ

**ВСЕРОССИЙСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА
ФИЗИОЛОГИИ, БИОХИМИИ И ПИТАНИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

Том XLI

ВНИИФБиП с.-х. животных



Боровск, 2002

УДК 636.084:577.1:579.6

ББК 45/46+28.9

Т 78

Труды Всероссийского научно-исследовательского института физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных. Сборник экспериментальных статей. Боровск, 2002, т.41, 149 с.

Редакционная коллегия: Матвеев В.А., Тараканов Б.В., Черепанов Г.Г.

Адрес: 249013 Боровск, Калужской области, ВНИИФБиП

Телефон: (095) 546-34-15

Факс: (08438) 4-20-88

ISBN 5-901656-06-7

© Коллектив авторов

© ВНИИФБиП с.-х. животных

СОДЕРЖАНИЕ

Тараканов Б.В., Николичева Т.А., Комкова Н.М., Полякова Л.Л. Исследование безвредности микроциногенного штамма <i>Escherichia coli</i> S 5/98 для лабораторных животных	4
Сапунов М.И., Тараканов Б.В., Макаре З.Н. Влияние скармливания рекомбинантного штамма <i>Lactobacillus</i> sp. 8 PA3 (pLF-SL2), несущего ген рилизинг-фактора соматотропного гормона, на молочную продуктивность коз	14
Долгов И.А., Долгова С.И. Влияние инфузии летучих жирных кислот на микрофлору и биосинтез витаминов комплекса В в рубце коров	20
Долгова С.И., Долгов И.А. Витамин В ₃ , В ₆ и В ₁₂ –синтезирующая активность микроорганизмов рубца коров	27
Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П., Лазаренко В.П., Чугреев А.Б. Влияние оптимизации уровня и качества обменной энергии в рационах на эффективность ее использования на продукцию и в энергетическом обмене у лактирующих коров	35
Лысов А.В. Метаболические аспекты обеспечения питательными веществами печени и молочной железы у лактирующих коров	43
Вострова Л.Н., Шмельков В.М., Мартюшов В.М., Лысов А.В., Гаранина Н.А., Панюшкин Д.Е. Поступление глюкозы и кетонных тел из желудочно-кишечного тракта в кровь при различном уровне крахмала в рационах лактирующих коров	54
Карпов Д.В. Влияние инфузии ЛЖК в рубец на обеспеченность молочных коров аминокислотами	63
Карпов Д.В. Обеспеченность организма коров аминокислотами при нагрузках субстратами.....	73
Харитонов Л.В., Кузнецов И.Л., Пронькина Е.Д., Великанов В.И. Влияние препаратов аминокислот на функциональное состояние и неспецифическую резистентность организма телят.....	83
Матвеев В.А., Галочкина В.П., Баранова И.А., Дворецкая Т.Н., Ельченинов Г.М. Влияние протеина с низкой распадаемостью в рубце на функциональную активность некоторых желез внутренней секреции и продуктивность откармливаемых бычков.....	97
Дудин В.И. О взаимосвязи антиокислительной функции витамина Е в организме свиней с уровнем жира в их рационе.....	105
Езерская Е.Я., Галочкин В.А. Иммуноферментный анализ видоспецифичных мышечных белков крупного рогатого скота и свиней.....	113
Гулюшин С.Ю., Ленкова Т.Н. Влияние танинов на интенсивность тканевого дыхания суточных цыплят-бройлеров.....	121
Гулюшин С.Ю., Морозов Д.Н. Исследование функции желудочно-кишечного тракта ваккат-кислородным методом под влиянием танинов...	130
Гаганов А.П., Ершов А.С., Григорьев Н.Г. Разработка малокомпонентных концентратных добавок на основе семян рапса и зернобобовых.....	141

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ МИКРОЦИНОГЕННОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* S 5/98 ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Б.В. Тараканов, Т.А. Николичева, Н.М. Комкова, Л.Л. Полякова
Лаборатория биотехнологии микроорганизмов
пищеварительного тракта

*В серии опытов изучена безвредность микроциногенного штамма *Escherichia coli* S5/98 (EcS 5/98) для мышей и кроликов. Установлено, что он обладает средней вирулентной дозой при введении в желудок мышам более 10^{11} микробных клеток на животное и более 10^9 микробных клеток при внутрибрюшинном введении. Указанный штамм не оказывает токсического, токсигенного и аллергенного действия на организм лабораторных животных, не раздражает неповрежденные слизистые оболочки и имеет низкий порог диссеминации во внутренние органы. По совокупности полученных данных штамм EcS 5/98 отнесен к четвертому классу опасности, т.е. является малоопасным для человека и животных*

Введение

В обеспечении хорошего здоровья и высокой продуктивности животных все большее внимание уделяется контролю за колонизацией пищеварительного тракта условно-патогенными и патогенными бактериями. С этой целью используют, как правило, пробиотические препараты, обеспечивающие ингибирующее действие на потенциальных кишечных патогенов путем продукции бактериоцинов и антибиотических веществ более широкого спектра действия. Вместе с тем, сравнительно недавно было показано, что энтеробактерии, кроме бактериоцинов, могут синтезировать низкомолекулярные вторичные метаболиты, получившие название микроцинов, которые подавляют рост эшерихий, сальмонелл, шигелл, клебсиелл, протей и других родов кишечных бактерий. В результате наших исследований установлено, что у крупного рогатого скота, свиней и птицы в кишечных популяциях бактерии родов *Escherichia* и *Salmonella* до 7,8-33,3% и 6,8-16,7% соответственно проявляют антагонистическую активность, тогда как продуценты микроцинов сравнительно редки. Выделенные нами микроциногенные штаммы подавляли 69-100% эшерихий и 42,6-80% сальмонелл дикого типа, изолированных из кишечника скота, свиней, цыплят и кошек. Поскольку полученные штаммы представляются перспективными для создания высокоэффективных пробиотиков, они в соответствии с ветеринарно-санитарными требованиями (Инструкция..., 1988; Доклад ВОЗ, 1994) должны пройти тщательную проверку на безвредность.

Исходя из вышеизложенного, задачей исследований было изучить безвредность микроциногенного штамма *Escherichia coli* S5/98 для лабораторных животных.

Материал и методы

Исследования проведены на белых мышах и кроликах. При изучении патогенности, определении средней смертельной дозы, ток-

сичности и токсигенности штамма E.coli S 5/98 (EcS 5/98), а также его способности к диссеминации во внутренние органы, эксперименты проводили на белых мышах обоего пола, приобретенных в питомнике “Столбовая”. Группы формировали после 2-недельного карантина из животных со стандартной живой массой тела 18-20г.

Мышей содержали в лаборатории в стандартных клетках, получали они полноценный рацион, состоящий из специального комбикорма ПК-121-1 (для лабораторных мышей и крыс) и пшеничной каши, приготовляемой в лаборатории, по 10 и 6 г на голову в сутки, соответственно. Гранулированный комбикорм был сбалансирован по аминокислотам, минералам и витаминам. В 100 г его содержалось (%): сырого протеина-19,3, обменной энергии-291 ккал, сырой клетчатки-4,1, сырого жира-4,2, кальция-1,2 и фосфора-0,79.

Испытания безвредности проводили с использованием методических подходов и методик, рекомендуемых для этих целей в соответствующих руководствах (Предтеченский и др., 1950; Орлов Ф.М., 1963) и методических указаний (Методические указания... , 1983, 1988).

Определение среднесмертельной дозы (LD_{50}). Из белых мышей было сформировано 14 групп по 6 особей в каждой группе. Изучаемый микроорганизм вводили 6 группам мышей внутрибрюшинно в дозах 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 и 10^{10} живых микробных клеток (м.к.), а следующим 6 группам – внутрижелудочно в тех же дозах. Двум контрольным группам мышей вместо препаратов вводили стерильный изотонический раствор хлорида натрия в дозе 1 мл – одним внутрибрюшинно, а другим внутрижелудочно. За выживаемостью и общим состоянием опытных мышей наблюдали в течение 30 сут. Среднесмертельной считали дозу, которая вызывала гибель 50% подопытных животных.

Взвесь микроорганизмов для введения готовили путем смыва физраствором колоний 18-24-часовых культур, выращенных на агаровой среде, и определяли количество живых бактериальных клеток в суспензии. Поскольку штамм EcS 5/98 является новым и ранее в опытах на кроликах не испытывался, была определена его острая токсичность при скормливаниях с кормом и путем введения в желудок. При этом использовали культуру с титром 3×10^9 м.к./мл для скормливания в дозах 5, 25 и 50 мл на одно животное, а при введении в желудок в дозах 60 и 80 мл. Внутрижелудочно культуру вводили через зонд по 20 мл 3 и 4 раза в сутки. Контрольные животные получали стерильную питательную среду в тех же дозах. Для испытания каждой дозы использовали по 4 кролика. После скормливания и внутрижелудочного введения штамма EcS 5/98 наблюдения за кроликами вели 3 недели. При этом учитывали следующие показатели: внешний вид и поведение животных, состояние шерстного покрова, работу пищеварительного тракта, поедаемость корма.

Изучение токсичности. Токсичность изучаемых микроорганизмов оценивали на мышах обоего пола, которым внутрибрюшинно вводили бактериальную культуру в дозах 10^9 и 10^{10} м.к./животное, предварительно убитую путем прогревания при 80°C в течение 30 мин, хотя в руководствах рекомендуют прогревание при 70°C -30 мин. Бактерии кишечной палочки штамма EcS 5/98 при температуре 70°C оставались живыми и при контрольном высеве на среду Эндо дали хороший рост. Мышам контрольной группы вводили внутрибрюшинно сте-

рильный раствор 0,9%-ного хлорида натрия. Наблюдения за животными вели в течение 15 сут, отмечая общее состояние, внешний вид, поведение и выживаемость.

Изучение токсигенных свойств. Подопытным мышам внутрибрюшинно вводили по 0,5 мл центрифугата 4- и 8-суточных культур, поскольку известно, что максимальной токсичностью обладают фильтраты 4-7-суточных культур микроорганизмов. Контрольным животным вводили такой же объем стерильной питательной среды, на которой выращивали данный вид бактерий. Наблюдения за опытными и контрольными мышами вели в течение 5 сут.

Изучение способности к диссеминации во внутренние органы. Было сформировано три группы мышей по 6 голов в каждой. Животным 1-й и 2-й групп в желудок и внутрибрюшинно вводили бактериальные культуры в дозе 10^{10} м.к./животное, а 3-й группе аналогично стерильный физраствор в таком же объеме – 0,5 мл.

Способность изучаемых микроорганизмов диссеминировать во внутренние органы животных оценивали по результатам микробиологических исследований крови и гомогенатов печени, почек и легких через 3 и 30 сут после введения мышам бактериальных культур.

Изучение местного токсического действия. Местное токсическое действие бактериального препарата оценивали путем нанесения культуры на кожу и слизистые оболочки глаза кроликов.

Кроликов в возрасте 1 года индивидуально содержали в виварии института в сетчатых клетках. Рацион был сбалансирован по основным питательным веществам и состоял в зимний период из 100 г злакового сена, 200 г комбикорма или зерна ячменя и 100 г разнотравного силоса. Суточный рацион содержал (г): кормовых единиц-225, сухого вещества-235, сырого протеина-29, переваримого протеина-19, сырой клетчатки-42, кальция-1,4 и фосфора-0,8.

Для исследований использовали кроликов альбиносов пород белый великан и калифорнийская. В каждой группе было по 6 животных. Для внесения в конъюнктивальный мешок взвеси микроорганизмов у кролика оттягивали верхнее веко и закапывали из пипетки 1-2 капли культуры, содержащей 10^8 м.к./мл, а в другой глаз закапывали такое же количество стерильной питательной среды. Реакцию учитывали ежедневно на протяжении 6 сут. При этом фиксировали гиперемию слизистой оболочки, отечность, инъекцию сосудов роговицы, ширину зрачка и состояние век (конъюнктивит, кератит).

При постановке кожной пробы шерсть на боку выстригали на площади 6х9 см и двукратно с интервалом в 24 ч втирали в кожу живую культуру микроорганизмов с числом клеток 10^8 /мл, а контрольным кроликам втирали стерильную питательную среду. Для определения реакции кожи измеряли толщину кожной складки до и после втирания культур ежедневно в течение 4 сут.

Аллергенные свойства микроорганизмов определяли на тех же животных, на которых испытывали местное токсическое действие на кожу. Кроликам альбиносам на один и тот же выстриженный участок кожи наносили путем втирания (на протяжении 8 сут) живую микробную культуру, а животным контрольной группы – стерильную питательную среду. Через 14 сут после последней аппликации препарата этим же кроликам вновь втирали культуру и питательную среду в той

же концентрации. Реакцию учитывали через 24 ч, в баллах: эритема – 1 балл, эритема и небольшой отек – 2 балла, выраженная инфильтрация – 3 балла, появление некроза – 4 балла.

Результаты и обсуждение

Поскольку известно, что бактерии рода *Escherichia* образуют термолабильные и термостабильные эндо- и экзотоксины (Емельяненко, 2000), опыты по острой токсичности мы проводили в два этапа. На предварительном этапе между дозами вводимого микроорганизма брали широкие интервалы, а на втором этапе дозу повышали или понижали, в зависимости от того, погибали мыши или оставались живыми. Для окончательной оценки дозы брали так, чтобы низшая доза не вызывала гибели животных, а высшая вызывала 100%-ную гибель.

В результате исследований установили, что наибольшую смертность вызывает внутрибрюшинное введение 20 млрд. микробных клеток на 1 мышь – 67%, доза в 10 млрд. вызывает гибель 50%, а доза 2 млрд. – 33%. Введение внутрибрюшинно 2×10^9 м.к./голову вызывало у животных угнетенное состояние и расстройство функций пищеварительного тракта уже через 2 ч после инъекции, хотя животные и не погибали (табл.1).

При вскрытии мышей, павших после введения EcS 5/98, не было обнаружено повреждений органов брюшной полости. Инфильтратов, крови, гематом в брюшной полости не было. Кишечник был слегка вздут, слизистая рыхлая, отечная, но без геморагий. Почки кровенаполнены, граница между корковым и мозговым слоями стерта. Печень светлорозовая, без кровоизлияний. Селезенка – вишневая, края слегка закруглены. Возможно, высокая смертность мышей была вызвана слишком большой дозой вводимых в организм бактерий, что отягощало его продуктами распада микробных клеток и являлось испытанием не только вирулентности, но и токсичности. При высеве на среду Эндо из органов павших мышей уже через 24 ч наблюдался обильный рост бактерий группы кишечной палочки.

Таким образом, в условиях данного эксперимента среднесмертельная доза EcS 5/98 при внутрибрюшинном введении находится выше 10^9 м.к./животное. При внутрижелудочном введении доз 10^9 и 10^{10} м.к./животное нам не удалось установить смертельную дозу и возможно она находится выше дозы 10^{11} м.к./голову.

В опытах на кроликах, при введении в желудок высоких доз EcS 5/98 – 10^{12} м.к./голову, гибели животных не наступало, хотя общее состояние было угнетенным, и кролики в течение 2-х сут отказывались от корма. При определении токсичности штамма мышам вводили внутрибрюшинно высокие дозы бактерий – 10^9 и 10^{10} м.к./животное. При этом падежа животных не наступало, но в течение 24 ч после введения у них наблюдалось угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова и вялость.

При изучении токсигенных свойств EcS 5/98 за 15 дней наблюдений не отмечалось изменений в поведении и общем состоянии как подопытных, так и контрольных животных, а также их гибели (табл.1). При определении воздействия живой культуры EcS 5/98 на слизистые оболочки глаз кроликов каких-либо изменений со стороны конъюнктивы, ро-

говицы и зрачка не обнаружено. Не было гиперемии слизистой, отечности или гнойных истечений из глаза. Отсутствовало и местное токсическое действие изучаемого штамма при нанесении на кожу кроликам. Не было утолщения кожной складки после втирания культуры, а болезненность, припухлость, повышение температуры в месте нанесения отсутствовали. Как показали исследования, штамм EcS 5/98 не обладает аллергенными свойствами: на месте нанесения культуры аллергической реакции в виде инфильтрации, изъязвления или некрозов ткани не наблюдалось.

Таблица 1. *Определение безвредности микроциногенного штамма EcS5/98 для лабораторных животных*

Вид жи- вотных	Путь введения микро- организмов	Контроль- ная группа	Испытуемые дозы культуры, м.к./голову						
			2 x10 ⁵	2 x10 ⁶	2 x10 ⁷	2 x10 ⁸	2 x10 ⁹	1 x10 ¹⁰	2 x10 ¹⁰
Определение среднесмертельной дозы									
Мыши	внутрибрюшинно	x0/9 ^{xx}	0/6	0/6	0/6	0/6	3/9	3/6	6/9
	внутрижелудочно	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Кролики	внутрижелудочно	0/4	-	-	-	-	0/4	0/4	0/4
Определение токсичности и токсигенности									
Мыши	внутрибрюшинно	0/6	-	-	-	-	0/6	0/6	0/6
	внутрибрюшинно	0/4					-	0/4	0/4
	4-суточная культура								
	внутрибрюшинно	0/4					-	0/4	0/4
	8-суточная культура								
Местное токсическое и аллергенное воздействие									
Кролики	в конъюнктивальный мешок	0/6						0/6	
	втирание в кожу	0/6						0/6	
	аллергенность	0/6						0/6	

Примечание. х - число погибших животных или давших реакцию на введение культуры;

xx - число животных в группе

Способность штамма EcS 5/98 диссеминировать во внутренние органы лабораторных животных при внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении культуры оценивали по результатам микробиологических исследований крови, печени, почек и легких через 3 и 30 сут после введения препарата. Данные этих исследований представлены в таблице 2. Оказалось, что через 3 сут после внутрибрюшинного введения штамма в посевах из печени и почек получен рост единичных колоний кишечной палочки. При внутрижелудочном введении рост бактерий обнаружен при высевах из легких. Посевы из крови у всех мышей оставались стерильными. У контрольных животных, которым вводили физиологический раствор, кровь и внутренние органы оставались стерильными. Посевы, сделанные через 30 сут после введения культуры, как из крови, так и из паренхиматозных органов, жизнеспособных бактерий не выявили.

Таким образом, эксперименты показали, что исследуемый штамм кишечной палочки хотя и способен к транслокации через тканевые барьеры организма мышей, но не сохраняется в органах длительное время, и через 30 сут внутренние органы подопытных животных становятся стерильными.

В те же сроки, когда проводили убой мышей, с целью определения диссеминации во внутренние органы, исследовали кровь от контрольных и опытных животных. Гематологические исследования показали (табл.3), что основные параметры крови контрольных и опытных мышей находились в пределах физиологической нормы (Никитин, 1949). Количества эритроцитов, лейкоцитов и гемоглобина в крови животных существенно не различались, но через 3 сут у мышей, которым культуру кишечной палочки вводили внутрибрюшинно, достоверно возросло число лейкоцитов и повысилась фагоцитарная активность ($P < 0,05$). Лейкоцитарная формула соответствовала лейкограмме здоровых животных. Эти данные свидетельствуют о том, что парентеральное введение штамма EcS 5/98 в организм лабораторных животных вызывает повышение защитной реакции.

Исходя из полученных данных и руководствуясь классификацией штаммов микроорганизмов по степени опасности (Методические указания..., 1983), изучаемый штамм EcS 5/98, обладающий средней вирулентной дозой при введении в желудок более 10^{11} микробных клеток на одно животное, а при введении внутрибрюшинно более 10^9 м.к./животное, а также имеющий низкий порог диссеминации во внутренние органы, по степени опасности относится к 4 классу и является малоопасным, практически не обладает аллергенным и общетоксическим действием.

Таблица 2. Микробиологические исследования способности штамма EcS 5/98 к диссеминации во внутренние органы

Вид животных	Путь введения микроорганизма	Группа животных	Высеваемость культуры из крови и внутренних органов							
			кровь		легкие		печень		почки	
			3 сут	30 сут	3 сут	30 сут	3 сут	30 сут	3 сут	30 сут
Мыши	внутрибрюшинно	контроль	^x 0/3 ^{xx}	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		опыт	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3
Мыши	внутрижелудочно	контроль	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		опыт	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3
Кролики	внутрижелудочно ежедневно в дозе			60 сут		60 сут		60 сут		60 сут
		контроль		0/3		0/3		0/3		0/3
		10 ⁸		0/3		0/3		0/3		0/3
		10 ⁹		0/3		1/3		1/3		1/3
		10 ¹⁰		1/3		1/3		1/3		1/3

Примечание: x - число животных с положительным результатом высева; xx – число животных в группе

Таблица 3. Показатели крови мышей при введении штамма EcS 5/98

Показатель	Группа животных и метод введения препарата					
	контроль		внутрибрюшинно		внутрижелудочно	
	3 сут	30 сут	3 сут	30 сут	3 сут	30 сут
Количество эритроцитов, млн/мкл	10,0	10,3	8,6	9,0	9,6	10,5
Количество лейкоцитов, тыс/мкл	6,0	6,0	8,5 ^x	6,7	6,2	6,4
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Гемоглобин, г/л	79	80	80	80	77	82
Лейкоцитарная формула, %:						
Базофилы		1		1		1
Эозинофилы		2		2		1
Псевдоэозинофилы:						
палочкоядерные		6		10		7
сегментоядерные		32		29		33
Лимфоциты		58		57		57
Моноциты		1		1		1
Фагоцитарная активность, %	14	15	27 ^x	18	16	17
Фагоцитарный индекс	1,2	2,0	3,1	2,7	2,6	2,3

Примечание: x – P< 0,05 – достоверность разницы показана в сравнении с контролем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Калужской области, грант N01-04-96027.

Заключение

В серии опытов изучена безвредность штамма *Escherichia coli* S 5/98 (EcS 5/98) для мышей и кроликов. Установлено, что микроциногенный штамм EcS 5/98 обладает средней вирулентной дозой при введении мышам в желудок более 10^{11} микробных клеток на животное, не оказывает токсичного, токсигенного и аллергенного действия на организм лабораторных животных, не раздражает неповрежденные слизистые оболочки и имеет низкий порог диссеминации во внутренние органы и ткани. По совокупности полученных данных изученный штамм EcS 5/98 отнесен к четвертому классу опасности, т.е. является малоопасным для человека и животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Инструкция о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предлагаемым для использования в составе рационов или для консервирования кормов с.-х. животных, продукция от которых идет в пищу населения В кн.: Ветеринарные препараты. Справочник. М.: Агропромиздат, 1988, 6: 230-239.
2. Стратегия оценки безопасности пищевых продуктов, полученных с помощью биотехнологии. Доклад организации здравоохранения (ВОЗ). Женева, 1994.
3. Предтеченский В.Е., Боровская В.М., Марголина Л.Т. Руководство по лабораторным методам исследований. М., Медгиз, 1950.
4. Орлов Ф.М. Ветеринарная лабораторная практика. М., 1963, 1
5. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве. В кн.: Ветеринарные препараты. Справочник. М.: Агропромиздат, 1988, 6: 239-289.
6. Методические указания к постановке исследований предельно допустимых концентраций производственных штаммов микроорганизмов и на их основе готовых форм препаратов в воздухе рабочей зоны. М., 1983.
7. Емельяненко П.А. Энтеротоксины кишечных бактерий. Ветеринария. 2000, 2: 25.
8. Никитин В.Н. Атлас клеток крови сельскохозяйственных животных. М., 1949.

**ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА
LACTOBACILLUS SP. 8 PA3 (pLF – SL2), НЕСУЩЕГО ГЕН
РИЛИЗИНГ-ФАКТОРА СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНА,
НА МОЛОЧНУЮ ПРОДУКТИВНОСТЬ КОЗ**

М.И. Сапунов, Б.В. Тараканов, З.Н. Макар
Лаборатории лактации и биотехнологии микроорганизмов
пищеварительного тракта

Добавление в рацион коз рекомбинантного штамма лактобацилл тормозит снижение молочной продуктивности в ходе лактации и повышает конверсию корма в компоненты молока. Полученные данные дают основание полагать, что пероральное применение рекомбинантного штамма Lactobacillus sp. 8 PA3 (pLF-SL2), экспрессирующего образование соматолиберина, может быть реальной альтернативой применению инъекций и имплантаций соматотропного гормона с целью повышения продуктивности молочного скота.

Введение

Ранее нами было показано, что введение коровам соматотропного гормона вызывает существенное увеличение молочной продуктивности и повышение эффективности использования корма на продукцию молока в результате усиления кровоснабжения вымени (Макар и др., 1992). Однако в настоящее время широкое применение экзогенного соматотропина в молочном скотоводстве ограничивается высокой стоимостью его производства, необходимостью проведения периодических инъекций и, в целом, настороженным отношением в обществе к применению гормональных препаратов в качестве стимуляторов продуктивности животных. Следовательно, практический интерес вызывает разработка недорогих способов повышения секреции эндогенного соматотропина у крупного рогатого скота.

В исследованиях, ранее проведенных лабораторией биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП, было обнаружено, что при применении с кормом рекомбинантных штаммов энтерококков и лактобацилл, несущих генную конструкцию, экспрессирующую релизинг-фактор соматотропного гормона, у подопытных животных наблюдаются эффекты, позволяющие предполагать усиление секреции соматотропного гормона (повышение прироста живой массы, повышение доли мышечной ткани и снижение жира в туше, увеличение плоидности ядер гепатоцитов, повышение митотической активности хондробластов в зонах продольного роста костей, изменения в ультраструктуре клеток аденогипофиза).

Исходя из этого, целью работы явилось испытание рекомбинантного штамма *Lactobacillus* sp. 8 PA3 (pLF-SL2) с геном релизинг-фактора гормона роста в качестве возможного стимулятора молочной продуктивности.

Материал и методы

Опыт проведен в виварии института на двух группах коз по 5 голов в каждой группе, находившихся на 3-м месяце лактации. Опыт состоял из двух периодов: предварительного (2 недели) и основного (6 недель). В конце предварительного периода эксперимента были сформированы группы животных – аналогов по живой массе, продуктивности, сроку лактации и возрасту. Животных содержали в индивидуальных клетках. Козы контрольной и опытной групп получали основной рацион согласно рекомендациям (Калашников, 1985). В основной период эксперимента опытной группе коз ежедневно скармливали с комбикормом по 35 мл жидкого препарата рекомбинантного штамма *Lactobacillus* sp. 8 PA3 (pLF-SL2), содержащего ген релизинг-фактора соматотропного гормона, или по 25×10^9 к.о.е. бактерий на голову в сутки. В ходе всего опыта ежедневно определяли молочную продуктивность и поедаемость кормов. Два раза в неделю определяли содержание в молоке белка с помощью колориметрического метода (Постхумус, 1965) и жира посредством прибора «Милкотестер» фирмы “Foss Electric” (Дания). Определяли содержание сухого вещества в потребленных животными кормах (Калашников, 1985) и рассчитывали его затраты на продукцию молока, скорректированного на 4-х процентную жирность.

Статистическую обработку экспериментального материала проводили по *t* критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Как видно из представленных в таблице 1 данных, добавление в корм коз лактобацилл, содержащих ген релизинг-фактора соматотропного гормона, не повлияло на живую массу животных и потребление ими кормов в ходе опыта.

Молочная продуктивность у всех животных снижалась по ходу опыта, однако, скармливание препарата рекомбинантного штамма *Lactobacillus* sp. 8 PA3 (pLF-SL2) тормозило этот спад (табл. 2). Так, животные обеих групп не различались по величине среднесуточного удоя в предварительный период опыта и в первые две недели основного его периода. В следующий 2-недельный период эксперимента наблюдалась выраженная тенденция к увеличению суточного удоя у опытной группы коз по сравнению с контрольной. На протяжении последующих

Таблица 1. Живая масса животных и потребление ими корма в ходе опыта

Период опыта	Недели опыта	Контрольная группа				Опытная группа			
		живая масса, кг	корма, кг			живая масса, кг	корма, кг		
			комби-корм	сено	силос		комби-корм	сено	силос
Исходный	1 - 2	36,0 ±2,29	0,7	1,30±0,00	1,31±0,13	34,7 ±2,89	0,7	1,30±0,00	1,10±0,14
	3 - 4		0,7	1,30±0,00	0,83±0,14		0,7	1,32±0,03	0,82±0,13
Основной	5 – 6	34,6 ±1,71	0,7	1,40±0,04	-	35,9 ±2,48	0,7	1,46±0,02	-
	7 - 8		0,7	1,40±0,02	-		0,7	1,41±0,02	-

Таблица 2. Суточный удой и состав молока

Период опыта	Недели опыта	Контрольная группа			Опытная группа		
		удой, г	белок, %	жир, %	удой, г	белок, %	жир, %
Исходный	1 – 2 %	1388 ±186,1 100,0	3,56 ± 0,049 100,0	4,21 ±0,169 100,0	1375 ± 113,4 99,1	3,36 ± 0,164 94,4	4,34 ± 0,218 103,1
	3 – 4 %	1287 ±189,8 100,0	3,22 ± 0,080 100,0	3,65 ±0,158 100,0	1292 ± 108,9 100,4	3,22 ± 0,111 100,0	3,81 ± 0,138 104,4
Основной	5 – 6 %	987 ± 82,6 100,0	3,10 ± 0,090 100,0	3,56 ±0,505 100,0	1186 ± 110,5 120,2	3,29 ± 0,187 106,1	3,82 ± 0,161 107,3
	7 – 8 %	942 ± 70,1 100,0	3,09 ± 0,073 100,0	3,92 ±0,140 100,0	1192 ± 93,5 * 126,5	3,43 ± 0,119 * 111,0	4,03 ± 0,095 102,8

Примечание: *P<0,05 по сравнению с контролем.

двух недель основного периода опыта это различие еще более возросло и стало статистически достоверным.

Опытная и контрольная группы коз существенно не отличались по содержанию жира в молоке (табл. 2), уровень которого колебался в ходе опыта и был наиболее высоким в предварительном периоде эксперимента. Концентрация жира в молоке контрольной и опытной групп коз составила соответственно в исходный период опыта 4,21% и 4,34%, а в течение двух последних недель основного периода – 3,92% и 4,03%.

Скармливание козам препарата рекомбинантного штамма *Lactobacillus* sp. 8 PA3 (pLF-SL2) способствовало повышению содержания белка в молоке (табл.2). В контрольной группе животных его уровень в начале быстро, а затем медленней снижался по ходу эксперимента. У этой группы коз в исходный период опыта концентрация белка в молоке составила 3,56%, а в конце основного периода она снизилась до 3,09%. В исходный период опыта содержание белка в молоке коз опытной группы было несколько ниже, чем у животных контрольной группы (3,36%). В первые две недели основного периода опыта оно снижалось в этой группе также, как и у контрольных животных. Однако, после двух недель применения препарата лактобацилл снижение концентрации белка в молоке прекратилось и началось ее возрастание. В течение последних двух недель основного периода эксперимента уровень белка в молоке у коз опытной группы повысился до 111,0% по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 3, применение препарата рекомбинантного штамма *Lactobacillus* sp. 8 PA3 (pLF-SL2), несущих генную конструкцию рилизинг-фактора соматотропного гормона, снижает затраты сухого вещества корма на продукцию скорректированного на 4-х процентную жирность молока.

В исходный период опыта козы контрольной и опытной групп существенно не различались ни по продукции 4%-ного молока, ни по эффективности использования сухого вещества корма на его образование. В это время суточная продукция молока 4%-ной жирности в контрольной и опытной группах коз составила соответственно 1439 г и 1463 г. На синтез 1 г такого молока в контрольной и опытной группах коз расходовалось соответственно 1,40 г и 1,34 г сухого вещества корма. Суточная продукция 4%-ного по жиру молока в обеих группах коз в целом снижалась по ходу опыта, а затраты сухого вещества корма на его синтез, напротив, возрастали. Достоверных различий между группами животных по этим показателям в первые две недели основного периода опыта не наблюдалось. Однако в дальнейшем опытная группа коз статистически достоверно превзошла контрольную группу по продукции скорректированного по жиру молока, а затраты сухого веществ-

Таблица 3. Влияние скармливания рекомбинантного пробиотика на молочную продуктивность и затраты сухого вещества корма на продукцию молока 4%-ной жирности у коз

Период опыта	Недели опыта	Контрольная группа		Опытная группа	
		продукция молока, г	корм/молоко ^а	продукция молока, г	корм/молоко ^а
Исходный	1 – 2	1439 ± 178	1,40 ± 0,11	1463 ± 93,9	1,34 ± 0,07
	%	100,0	100,0	101,6	105,6
Основной	3 – 4	1137 ± 116	1,67 ± 0,10	1223 ± 99,7	1,57 ± 0,094
	%	100,0	100,0	107,6	106,7
	5 – 6	879 ± 40,7	2,02 ± 0,046	1118 ± 81,3*	1,64 ± 0,065*
	%	100,0	100,0	127,2	122,0
	7 – 8	937 ± 69,0	1,89 ± 0,075	1202 ± 101,1*	1,49 ± 0,075*
	%	100,0	100,0	128,3	126,4

Примечание: ^а г сухого вещества корма/ г молока; * P<0,05

ва корма на его синтез, напротив, существенно понизились по сравнению с контрольной группой (табл. 3). В конце основного периода опыта суточная продукция скорректированного по жиру молока составила у коз контрольной группы 937 г, а у коз опытной группы – 1202 г. В течение последних двух недель основного периода опыта, на синтез 1 г такого молока животным контрольной группы требовалось 1,89 г сухого вещества корма, а животным опытной группы – лишь 1,49 г.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Калужской области. Грант № 02-04-96024.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных нами опытов свидетельствуют, что скармливание козам препарата рекомбинантного штамма лактобацилл, с геном рилизинг-фактора соматотропного гормона, тормозит снижение молокообразования в ходе лактации и повышает эффективность использования корма на синтез компонентов молока.

Полученные данные дают основание полагать, что пероральное применение рекомбинантного штамма *Lactobacillus* sp. 8 PA3 (pLF-SL2), экспрессирующего образование соматолиберина, может быть реальной альтернативой применению инъекций и имплантаций соматотропного гормона с целью повышения продуктивности молочного скота.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калашников А.П., Клейменов Н.И., Баканов В.Н. и др. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. М.: Агропромиздат, 1985. 352 с.
2. Макар З.Н., Жестоканов О.П., Плишкина К.И., Тверской Г.Б. Влияние рекомбинантного соматотропина на кровоснабжение вымени и молочную продуктивность коров. Бюлл. ВНИИФБиП с.-х. животных. 1992. 2-3 (103-104): 83-90.
3. Постхумус Г. Массовые исследования содержания белка в молоке колориметрическим методом. В кн.: Методы определения белка в молоке. М.: Колос, 1965: 72-86.

ВЛИЯНИЕ ИНFUЗИИ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА МИКРОФЛОРУ И БИОСИНТЕЗ ВИТАМИНОВ КОМПЛЕКСА В В РУБЦЕ КОРОВ

И.А. Долгов, С.И. Долгова
Лаборатория пищеварения

На рационе, соответствующем 80%-ному уровню потребности по питательным веществам согласно детализированных норм, изучали влияние инфузии летучих жирных кислот (ЛЖК) в рубец коров на микрофлору и биосинтез витаминов комплекса В. Показано, что введение в рубец ЛЖК оказывает выраженное регулирующее действие на микрофлору, которое проявляется стимуляцией роста бактерий, биосинтеза водорастворимых витаминов, повышением целлюлозолитической активности, снижением численности инфузорий и амилолитической активности.

Введение

В результате бактериальной ферментации в преджелудках жвачных образуется значительное количество ЛЖК, которые используются организмом животного в качестве источников энергии и метаболитов, участвующих в биосинтетических процессах, являясь одновременно стимуляторами роста многих микроорганизмов. При скармливании жвачным рационов с высоким содержанием зерна, в рубце накапливаются незначительные количества лактата, который метаболизируется далее другими бактериями. Многие микроорганизмы рубца продуцируют муравьиную и янтарную кислоты, которых, однако, в преджелудках содержится незначительное количество. Это свидетельствует о их использовании микроорганизмами в процессах обмена. Некоторые из бактерий, способных утилизировать кислоты в рубце, идентифицированы: *Peptostreptococcus elsdenii*, *Vibrio succinogenes*, *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella alcalescens*.

Молочнокислые бактерии явились объектом, на котором впервые было показано положительное влияние уксусной кислоты на рост микроорганизмов. Фактором роста для отдельных молочнокислых бактерий может служить муравьиная кислота (30-50 мкг/мл). Известно, что ацетат стимулирует рост некоторых групп бактерий рубца, особенно когда главным источником азота является аммиак (Hungate, 1964). Это позволило предположить, что ацетат может служить важным источником углерода для биосинтеза некоторых аминокислот. Использование углерода ацетата в синтезе аминокислот обнаружено у *Ruminococcus flavefaciens*. Опыты с инфузо-

риями, инкубируемыми в среде с 2-¹⁴C-ацетатом, показали, что значительное количество меченого углерода включалось в аланин, аспартат и глутамат. Для роста большинства штаммов *Bacteroides ruminicola*, ферментирующих крахмал с образованием янтарной, муравьиной и уксусной кислот, 2-метил-бутират или изомасляная кислота являются хорошим стимулятором роста, особенно когда среда не содержит пептидов, а для некоторых штаммов изомасляная кислота крайне необходима (Dehority, 1966).

Одной из важнейших функций микроорганизмов рубца жвачных животных является расщепление клетчатки – основного компонента грубых кормов. В связи с тем, что клетчатка составляет основную часть растительных кормов, большое внимание уделяется вопросам стимуляции развития целлюлозолитических микроорганизмов, на жизнедеятельность которых в преджелудках жвачных животных существенно влияют структура рациона, источник и количество клетчатки в последнем, а также степень измельчения, лигнификации кормов и другие факторы. Эффективность использования клетчатки в рубце колеблется от 30 до 80% и зависит в значительной мере от активности целлюлозолитической микрофлоры. В опытах *in vitro* установлено, что добавление к содержимому рубца валериановой и изовалериановой кислот стимулирует переваривание целлюлозы. Введение в среду изомасляной, изовалериановой и 2-метилмасляной кислот активизирует рост культур вида *Bacteroides succinogenes*. Экспериментально показано, что изомасляная и изовалериановая кислоты используются этими бактериями для синтеза клеточных фосфолипидов (Bryant, 1955). Валериановая и изовалериановая кислоты не только стимулируют целлюлозолитическую активность микроорганизмов, но и синтез бактериального белка (Cline, 1966). При включении в среду валериановой или смеси валериановой, изовалериановой и изомасляной кислот стимулируется активность целлюлозолитических бактерий (Долгов, 1982). В опытах на животных показано, что после введения бутирата в рубец концентрация мочевины значительно уменьшалась (Norton, 1982). При инфузии бутирата в рубец голодающим животным отмечали частый митоз в эпителиальных клетках сосочков, появление крупных с базальным окрашиванием клеток, которые окружали нативные эпителиальные клетки, и увеличение частоты их дегенерации (Sacata, 1978). После введения пропионата в рубец потребление коровами корма снижалось с 19,9 до 17,37 кг/сутки (Frobish, 1977). Не отмечено существенных изменений удоя и состава молока после инфузии в рубец коровам пропионата (15/моль/гол/сутки). По данным Rulquin (1982) при введении смеси ЛЖК удой не изменялся, в молоке снижалось количество жира на 5% и увеличивалось содержание белка на 3%, выход жирных кислот снижался на 18%. Введение казеината натрия в 12-перстную кишку

вызывало повышение удоя на 20%, белка – на 36%, жира – на 15% и лактозы – на 14%. Автор подчеркивает, что полноценный протеин, введенный в кишечник, более эффективно влияет на секрецию компонентов молока, чем введение в рубец ЛЖК преимущественно в виде пропионовой кислоты.

Вопрос о влиянии инфузии ЛЖК в рубец на микрофлору и биосинтез витаминов комплекса В еще мало изучен, выяснение его и явилось задачей наших исследований.

Материал и методы

Опыт проведен на трех лактирующих коровах холмогорской породы, имевших фистулы рубца и 12-перстной кишки. Рацион животных в предварительном периоде соответствовал 80%-ной потребности в обменной энергии и состоял из 5,1 кг злаково-бобового сена, 12 кг кормовой свеклы и 6,3 кг комбикорма. В опытный период восполнение энергии рациона с 80 до 100% осуществлялось за счет инфузии в рубец смеси, состоящей из ацетата, пропионата и бутирата и в 12-перстную кишку – казеината натрия, глюкозы и жирных кислот.

Материалом для микробиологических исследований служило содержимое рубца, которое брали через 3 ч после утреннего кормления. В исследуемом материале определяли общее количество микроорганизмов по Бриду, численность инфузорий и их родовой состав в счетной камере Горяева, амилалитическую активность фотометрическим методом (Долгов, 1972), а целлюлозолитическую активность весовым методом с использованием оптимизированной среды (Долгов, 1982).

Водорастворимые витамины определяли в крови, кормах и содержимом рубца микробиологическими (пробирочными) методами: витамин В₃ с индикаторной культурой *Saccaromycodes Ludwigii* КМ (Куцева, 1961), витамин В₆ с *Saccharomyces carlsbergensis* (Помощникова, 1995) и витамин В₁₂ с тест-культурой *E. coli* ПЗ-3 (Городецкий, 1982; Куцева, 1961).

Результаты и обсуждение

Исследованиями установлено, что после инфузии в рубец коров ЛЖК, эквивалентных по обменной энергии 20% питательности рациона, наблюдалось увеличение общего количества микробов и целлюлозолитической активности содержимого (табл. 1). Вместе с тем, численность инфузорий и амилалитическая активность снижались. При этом фауна в основном была представлена родом *Entodinium*. Увеличение численности бактерий в рубце подопытных коров свидетельствует о благоприятном действии ЛЖК

на синтез микробного белка, что подтверждается данными биохимических исследований, которые показали, что используемые ЛЖК могут служить в качестве источника углерода для биосинтеза некоторых аминокислот (Cline, 1966; Hungate, 1964). Снижение амилалитической активности содержимого рубца при использовании ЛЖК должно было бы предположительно сопровождаться большим поступлением крахмала в 12-перстную кишку и наиболее эффективно использоваться в нижележащих отделах пищеварительного тракта.

При скармливании кормов, в 1 г сухого вещества которых содержалось 6,5 и 2,2 мкг пантотеновой кислоты и пиридоксина, в химусе рубца их обнаружено 11,98 и 3,13 мкг соответственно. Корма растительного происхождения, составляющие в рационе коров 100%, не содержат витамина В₁₂, тогда как в содержимом рубца концентрация этого витамина составила 62,64 мкг/100 г сухого вещества. Введение в рубец раствора ЛЖК активизировало биосинтез микрофлорой витаминов В₃, В₆ и В₁₂ соответственно на 7,9, 11,8 и 9%.

Таблица 1. Микробиологические и биохимические показатели содержимого рубца коров

Показатели	Уровень кормления	
	80%	80% + ЛЖК
Общее количество микробов, млд/мл	8,59±0,85	9,97±0,92
Число инфузорий, тыс/мл	245,6±45,9	142,5±34,4
Соотношение родов инфузорий, тыс/мл:		
Isotricha	7,6	0,6
Dasytricha	4,2	2,4
Entodinium	60,7	84,6
Diplodinium	19,0	8,9
Epidinium	6,0	3,5
Ophryoscolex	2,5	0
Ферментативная активность микроорганизмов:		
амилолитическая, ед/мл	41,3±6,19	30,2±2,42
целлюлозолитическая, %	6,96±0,88	7,85±0,98
Концентрация витаминов комплекса В:		
В ₃ , мкг/г	11,98±0,87	12,93±0,4 9
В ₆ , мкг/г	3,13±0,37	3,50±0,49
В ₁₂ , мкг/100 г	62,64±1,53	6 8,28±1,40

Метаболизм пропионовой кислоты в значительной мере зависит от интенсивности биосинтеза цианкобаламина в пищеварительном тракте. При этом следует подчеркнуть, что наблюдается сравнительное постоянство соотношений в образовании пропионовой кислоты и цианкобаламина в рубце. В связи с этим можно предположить, что интенсивность биосинтеза витамина В₁₂ в рубце у жвачных животных регулируется в большей степени бактериями, образующими пропионовую кислоту.

Согласно литературным данным при получении витамина В₁₂ методом термофильного метанового брожения установлено, что добавление специфических субстратов приводило к повышению биосинтеза цианкобаламина и особенно большой выход был при добавлении уксусной кислоты и метанола (Букин, 1971). Известно, что водорастворимые витамины способствуют расщеплению целлюлозы. Так, для роста некоторых штаммов целлюлозолитических руминококков требуется витамин В₁₂. Многие штаммы *Butyrivibrio fibrisolvens* хорошо растут в средах, содержащих один из компонентов витаминов группы В. Для получения дополнительных данных, которые позволили бы прийти к обоснованному заключению, были проведены опыты *in vitro* по изучению влияния витамина В₁₂ и кобальта на целлюлозолитическую активность микробной ассоциации рубца. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние кобальта и витамина В₁₂ на целлюлозолитическую активность микроорганизмов рубца

Вариант опыта	Целлюлозолитическая	% к контролю
Питательная среда (ПС)	8,32±0,67	100
ПС + 0,1 мкг/мл кобальта	9,24±1,05	111
ПС + 0,5 мкг/мл кобальта	9,54±1,04	115
ПС + 1,0 мкг/мл кобальта	9,29±1,56	112
ПС + 0,1 мкг/мл витамина В ₁₂	12,93±1,80	155
ПС + 0,15 мкг/мл витамина В ₁₂	12,25±1,33	147
ПС + 0,20 мкг/мл витамина В ₁₂	11,94±0,66	144

Из таблицы следует, что включение в состав питательной среды 0,1-1,0 мкг/мл кобальта повышало целлюлозолитическую активность микрофлоры в среднем на 12%. При внесении в среду витамина В₁₂ в дозе 0,1-

0,2 мкг/мл целлюлозолитическая активность микрофлоры возрастала по сравнению с контролем на 49% и была выше, чем при добавлении кобальта на 34%. Следовательно, целлюлозолитические бактерии являются активными потребителями цианкобаламина, т.е. являются аукогетеротрофами. На основании изложенного отчасти становится понятным механизм повышения численности микроорганизмов и их целлюлозолитической активности при инфузии в рубец растворов ЛЖК.

Инфузия ЛЖК в рубец незначительно повышала содержание витаминов комплекса В в крови, но не увеличивала их использование молочной железой (табл.3).

Таблица 3. Содержание водорастворимых витаминов в крови и показатели их использования в молочной железе у подопытных коров

Витамины	Содержание витаминов в крови		АВР	Использование из артериальной крови, %
	сонная артерия	молочная вена		
До инфузии				
В ₃ , мкг/100мл	52,6±1,2	50,3±1,3	2,3	3,27
В ₆ , мкг/100мл	6,31±0,4	6,23±0,2	0,08	1,1
В ₁₂ , мкг/л	0,490±0,14	0,449±0,09	0,041	9,1
После инфузии ЛЖК				
В ₃ , мкг/100мл	59,0±6,0	56,6±5,0	2,4	3,13
В ₆ , мкг/100мл	6,42±0,5	6,38±0,5	0,04	0,74
В ₁₂ , мкг/л	0,641±0,014	0,602±0,076	0,039	6,5

Таким образом, восполнение энергии в рационе коров с 80 до 100% за счет инфузии в рубец ЛЖК повышало общее количество микроорганизмов и их целлюлозолитическую активность, а также биосинтез витаминов комплекса В. Вместе с этим численность инфузорий и амилолитическая активность снижались.

Частичное восполнение энергии в рационе коров за счет инфузии в рубец ЛЖК, исходя из полученных данных, является вполне возможным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Букин В.Н., Быховский В.Я., Панцхава Е.С. Биохимические и микробиологические основы получения витамина В₁₂ методом термофильного метанового брожения. В сб.: Витамин В₁₂ и его применение в животноводстве. М. 1971, 9:24.
2. Городецкий А.А. Методические рекомендации по определению кобаламинов в биологических субстратах. Дубровицы, 1982.

3. Долгов И.А. Влияние ЛЖК в условиях *in vitro* на жизнедеятельность целлюлозолитических бактерий рубца коров. Сельхоз.биология. 1981, 26, 2: 227-229.
4. Долгов И.А. Определение амилалитической активности рубцового содержимого. Методическое руководство. Боровск, 1972, 2: 87.
5. Долгов И.А. Питательная среда для культивирования целлюлозолитических микроорганизмов. А.с. 981357. Б.И. 1982, 46.
6. Куцева Л.С. Микробиологические методы определения витамина В₁₂. В сб.: Витаминные ресурсы и их использование. М. 1961, 5: 133-144.
7. Островский Ю.М. Экспериментальная витаминология (справочное пособие). Минск, 1979.
8. Помощникова И.А. Микробиологический метод определения пантотеновой кислоты. В сб.: Витаминные ресурсы и их использование. М, 1955:152-157.
9. Bryant M., Doetsch R. A study of actively cellulolytic rod shaped bacteria of the bovine rumen. J. Dairy Sci., 1955, 38: 340.
10. Dehority B. Characterization of several bovine rumen bacteria isolated with xylan medium. J. Bacteriol., 1966, 95, 5: 1724-1729.
11. Cline T., Garrigus U., Hatfield E. Addition of branched and straight chain volatile fatty acids to purified lamb diets and effects on utilization of certain dietary component. J. Anim. Sci., 1966, 25, 3: 734.
12. Frobish R., Davis C. Effect of abomasal infusions of glucose and propionate on milk yield and composition. J. Dairy Sci., 1977, 60, 2: 204-209.
13. Hungate R., Bryant M., Mah R. The rumen bacteria and protozoa. Ann. Rev. Microbiol., 1964, 18: 131-166.
14. Norton B. The effect of intraruminal infusions of sodium butyrate on urea metabolism in sheep. Brit. J. Nutrit., 1982, 48, 2: 265-274.
15. Rulquin H. Effect sur la digestion et le metabolisme des vaches laieres d'infusions d'acides Volatils dans le rumen et de caseinate dans le duodenum. 1. Production et digestion – Reproduct. Nutrit. Developpem., 1982, 22, 6: 905-921.
16. Sacata T., Tamate H. Influence of butyrate on the microscopic structure of ruminal mucosa in adult sheep. Japan. J. Zootechn. Sci., 1978, 49, 9: 687-696.
17. Wegner G., Foster E. Incorporation of isobutyrate and valerate into cellular plasmalogen by *Bacteroides succinogenes*. J. Bacteriol., 1963, 85: 53-61.

ВИТАМИН В₃, В₆ и В₁₂ – СИНТЕЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ РУБЦА КОРОВ

С.И. Долгова, И.А. Долгов
Лаборатория пищеварения

В in vitro опытах установлено, что витамины В₃, В₆ и В₁₂ обнаруживаются как в биомассе бактерий, так и в культуральной жидкости. Штаммы одних видов микроорганизмов синтезируют значительное количество различных витаминов группы В, а другие - только отдельные из них. Максимальное количество витаминов обнаруживается до начала старения культур и находится в прямой зависимости от уровня и соотношения углеводов и азота в среде. На интенсивность синтеза витаминов существенное влияние оказывает также источник углевода в среде.

Введение

Одной из важнейших особенностей процесса пищеварения у жвачных животных является деятельность разнообразной микрофлоры, обитающей в преджелудках. Под действием последней питательные вещества кормов подвергаются довольно сложным превращениям, в результате чего образуются ЛЖК, аминокислоты, аммиак и другие метаболиты, которые используются в обменных процессах организма животного. Микрофлора рубца, используя аммиак в качестве основного источника азота, синтезирует аминокислоты и высокоценные белки, содержащие заменимые и незаменимые аминокислоты, осуществляет гидрогенизацию липидов, продуцирует витамины и другие биологически активные вещества.

Витамины комплекса В в качестве составляющих входят в простетические группы энзиматических систем, т.е. являются частью биологических катализаторов, управляющих процессами обмена веществ в организме животного. В витаминах комплекса В нуждаются все живые клетки.

При изучении взаимоотношения витаминов с микроорганизмами установлено, что большая часть из них участвует в обмене веществ всех микробов. Если определенные микроорганизмы не нуждаются в поступлении каких-либо витаминов извне, это свидетельствует о способности данного вида синтезировать необходимые ему факторы роста. В настоящее время вполне правомерно утверждение, что неизвестно почти ни одного витамина, признанного важным для животных, который не был бы необходим для микроорганизмов, и наоборот, почти все витамины, принимающие

участие в метаболизме микробной клетки, находят свое место в обмене организмов (Мейсель, 1952).

Исследованиями зарубежных и отечественных ученых установлено, что в рубце жвачных животных происходит синтез всех витаминов комплекса В, в том числе пантотеновой кислоты, пиридоксина и цианкобаламина. Однако витаминсинтезирующие свойства некоторых видов микроорганизмов рубца не изучены и практически не выяснены механизмы регуляции синтеза витаминов. Изучению данного вопроса и посвящена настоящая работа.

Материал и методы

Опыт проводили на 8 лактирующих коровах-первотелках холмогорской породы средней живой массой 460 кг в условиях вивария. Состав рациона, условия кормления и содержания животных приведены в статье Долговой и соавт. (2000). Материалом для микробиологических исследований служило содержимое рубца, которое брали до кормления, затем через 3 и 5 ч после него. Выделение амилалитических бактерий проводили на крахмальном агаре с рубцовой жидкостью (Долгов, 1977). Для выделения бифидобактерий использовали питательную среду Блаурокка в модификации Гончаровой (Биргер, 1982). Определение принадлежности выделенных бактерий к роду *Bifidobacterium* проводили с использованием морфологических критериев и теста на активность фруктозо-6-фосфокетотазы (Scardovi, 1986). Выделение лактатферментирующих бактерий проводили на среде Gutierrez (1953). Культивировали микроорганизмы с использованием анаэробной техники (Hungate, 1950; Bryant, Burkey, 1953).

Микроорганизмы выращивали в термостате при температуре 39°С, идентифицировали общепринятыми методами с использованием определителя Бердже (Заварзин, 1997). Продуцирование пантотеновой кислоты, пиридоксина и цианкобаламина отдельными видами микроорганизмов при разных условиях культивирования изучали на синтетической среде.

Витамины группы В определяли микробиологическими пробирочными методами: витамин В₃ с индикаторной культурой *Saccharomycodes Ludwigii* КМ, витамин В₆ - с *Saccharomyces Carlsbergensis* и витамин В₁₂ - с тест-культурой *E. coli* 113-3.

Результаты и обсуждение

Исследованиями установлено, что многие микроорганизмы рубца оказались активными продуцентами витаминов комплекса В и по своим

морфологическим свойствам были представлены кокковыми формами и палочками (табл.1,2).

Из таблицы 1 следует, что наиболее активный продуцентом витамина В₁₂ является *Peptostreptococcus elsdenii*. Несколько слабее синтезировали цианкобаламин отдельные штаммы, относящиеся к виду би-фидобактерий и *Str. bovis* (табл. 2). К микроорганизмам рубца, синтезирующим витамин В₁₂ относится также *Selenomonas ruminantium* (Dryden et al., 1962). Проведенные нами исследования показали, что повышение уровня энергии в рационе коров за счет зерна кукурузы приводило к увеличению численности селеномонад на 47%.

Таблица 1. Интенсивность синтеза витаминов комплекса В различными микроорганизмами

Микроорганизмы	Витамины, мкг/100 мл		
	В ₃	В ₆	В ₁₂
<i>Pept. elsdenii</i> шт. 14	следы	0	5,38±0,26
<i>Pept. elsdenii</i> шт. 17	0	0	4,95±0,54
<i>Bif. ruminale</i> шт. 13	2,31±0,19	9,24±0,32	3,60±0,48
<i>Bif. ruminale</i> шт. 15	10,12±0,55	8,21±0,64	2,77±0,29
<i>Bif. globosum</i> шт. 7	6,32±0,27	0	4,31±0,25
<i>Bif. globosum</i> шт. 16	4,75±0,20	7,56±0,35	0
<i>Cl. butyricum</i>	2,71±0,12	3,92±0,18	0

Довольно активно витамин В₃ синтезировали выделенные из рубца штаммы *Bif. ruminale* и *Bif. globosum*, а также амилалитические стрептококки, относящиеся к виду *Str. bovis* и *Cl. butyricum*.

Установлено, что пиридоксин активно синтезируют *Str. bovis*, *Bif. ruminale* и отдельные штаммы *Bif. globosum*. Кроме того, витамин В₆ способны продуцировать *Cl. butyricum*.

Как следует из таблицы 2, четыре культуры стрептококков из восьми оказались активными продуцентами витаминов В₃, В₆ и В₁₂. Две культуры синтезировали по два витамина. Так, например, *Str. bovis* штамм 5 синтезировал витамины В₃ и В₁₂, а штамм 38 - витамины В₆ и В₁₂. Две культуры продуцировали по одному витамину: штамм 18 синтезировал витамин В₆, а штамм 40 – В₁₂.

Следует отметить, что большая часть витаминов в рубце продуцируется в результате симбиотической взаимосвязи микроорганизмов. Поэтому выделение чистых культур отдельных видов рубцовых бактерий и особенно установление наличия синтеза витаминов сопряжено с большими трудностями, заключающимися в том, что биологически активные вещества в рубце в ряде случаев продуцируются несколькими видами микроорга-

низмов, каждый из которых осуществляет определенный этап этого синтеза. Так, например, установлено, что *Str. faecalis* осуществляет синтез фолиевой кислоты только до фенилаланина, а *L. arabinosus* завершает последующую реакцию (фенилаланин - парааминобензойная кислота - фолиевая кислота) (Nurmikko, 1954). Ни один из этих микроорганизмов не способен синтезировать фолиевую кислоту самостоятельно, но они могут осуществлять этот синтез в симбиозе.

Таблица 2. Биосинтез витаминов группы В различными штаммами *Str. bovis*, мкг/100 мл

Штаммы	Интенсивность роста, мг/мл	Витамины			Конечное значение pH среды
		В ₃	В ₆	В ₁₂	
5	2,17±0,07	6,31±0,22	0	2,07±0,19	5,5
8	1,99±0,06	4,25±0,24	4,97±0,19	1,78±0,12	5,6
15	2,38±0,11	6,85±0,44	5,98±0,51	2,35±0,14	5,4
16	2,56±0,08	7,21±0,29	6,10±0,37	2,49±0,23	5,2
18	2,18±0,12	0	5,37±0,19	0	5,5
34	1,98±0,07	4,48±0,37	5,50±0,24	1,66±0,09	5,3
38	1,67±0,14	0	5,56±0,33	2,07±0,17	5,4
40	1,57±0,06	0	0	2,56±0,24	5,6

Исследования показали также, что наиболее активный синтез витаминов В₃, В₆ и В₁₂ наблюдался при культивировании ассоциата бактерий рубца на комплексной питательной среде с крахмалом, целлобиозой и глюкозой (табл.3). Несколько ниже синтез изучаемых витаминов установлен при культивировании микроорганизмов на среде с крахмалом и сахарозой. При выращивании на среде с целлюлозой наблюдался самый низкий синтез указанных витаминов.

Таблица 3. Биосинтез витаминов группы В ассоциатом бактерий рубца, мкг/100 мл среды

Субстрат	Витамины		
	В ₃	В ₆	В ₁₂
Крахмал+целлобиоза+глюкоза	6,27±0,28	7,37±0,31	3,28±0,19
Крахмал	5,69±0,15	6,18±0,24	2,84±0,09
Сахароза	4,45±0,21	5,12±0,17	2,14±0,14
Целлюлоза	2,12±0,10	2,74±0,09	1,21±0,03

Одним из наиболее постоянных обитателей рубца жвачных животных является *Str. bovis*, который служит индикатором биологической пол-

ноценности рациона и нормального физиологического состояния животного. В связи с этим определенный интерес представляло изучение влияния концентрации субстрата (крахмал, мочевины) в среде на интенсивность синтеза витаминов комплекса В стрептококками. Установлено, что с увеличением дозы крахмала в среде с 0,1 до 0,7% интенсивность синтеза изучаемых витаминов возрастала (табл.4). Дальнейшее добавление субстрата не способствовало стимулированию их синтеза, хотя количество бактериальной массы при повышении концентрации крахмала возрастало.

Таблица 4. Влияние концентрации крахмала в среде на интенсивность биосинтеза витаминов группы В *Str. bovis* штамм 16

Концентрация крахмала в среде, %	Витамины, мкг/100 мл			Биомасса, мг/мл	Конечное значение pH среды
	В ₃	В ₆	В ₁₂		
0,1	1,94±0,32	2,75±0,21	1,22±0,07	0,84±0,06	5,8
0,3	3,27±0,20	4,58±0,21	1,98±0,08	1,61±0,09	5,6
0,5	7,51±0,42	8,98±0,37	2,35±0,12	2,56±0,12	5,5
0,7	7,38±0,24	8,28±0,27	2,28±0,14	3,33±0,14	5,4
0,9	4,95±0,31	4,26±0,24	2,10±0,12	3,71±0,21	5,3
1,0	1,24±0,07	2,54±0,19	1,15±0,08	3,69±0,07	5,4

Экспериментальные данные показали, что по мере добавления к питательной среде мочевины наблюдалось усиление интенсивности синтеза изучаемой группы витаминов, достигающее максимальной величины при соотношении мочевины к крахмалу 1:5 (табл.5)..

Таблица 5. Влияние концентрации мочевины в среде на интенсивность биосинтеза витаминов группы В *Str. bovis*, мкг/100 мл

Концентрация мочевины в среде, мг	Отношение мочевины: крахмал	Витамины, мкг/100 мл			Биомасса, мг/мл
		В ₃	В ₆	В ₁₂	
50	1:20	2,26±0,13	1,88±0,07	0,68±0,06	1,19±0,12
100	1:10	4,94±0,21	4,17±0,16	2,21±0,11	1,31±0,10
200	1:5	8,26±0,13	7,75±0,41	2,36±0,16	1,76±0,17
300	1:3	5,10±0,32	4,91±0,26	1,85±0,11	1,22±0,11
400	1:2,3	4,99±0,33	4,22±0,19	1,28±0,11	1,16±0,09
500	1:2	3,31±0,17	4,12±0,12	1,11±0,08	0,90±0,02
1000	1:1	2,27±0,11	3,38±0,37	1,37±0,12	0,71±0,03

Оптимальное соотношение мочевины к крахмалу в питательной среде обуславливает и максимальное накопление биомассы. Дальнейшее

увеличение мочевины ингибировало биосинтетическую активность стрептококков

Таким образом, биосинтез витаминов комплекса В микроорганизмами не является стабильным, а изменяется в зависимости от уровня азота и легкоферментируемых углеводов в среде.

Проведенные нами исследования показали, что совместное культивирование отдельных штаммов *Str. bovis* с бифидобактериями взаимно усиливает их витаминсинтезирующую активность. При этом биосинтез пантотеновой кислоты в пересчете на грамм сухой биомассы составил 50,33, пиридоксина – 14,41 и цианкобаламина – 32,55 мкг (табл.6).

Таблица 6. Интенсивность биосинтеза витаминов комплекса В ассоциатом ауксотрофов

Витамины	Концентрация витаминов в среде, мкг/100 мл		Содержание витаминов в биомассе, мкг/г
	до инкубации	после инкубации	
B ₃	следы	17,26±2,78	50,33±5,23
B ₆	следы	14,21±1,99	12,41±0,99
B ₁₂	следы	3,98±0,69	32,55±2,31

Максимальное содержание пантотеновой кислоты, пиридоксина и цианкобаламина в среде установлено до начала старения культур (табл.7).

Таблица 7. Влияние фазы роста на витаминсинтезирующую активность Str. bovis

Фазы роста	Витамины, мкг/100 мл		
	B ₃	B ₆	B ₁₂
Начало экспоненциального роста	3,36±0,27	2,96±0,32	0,97±0,05
Конец экспоненциального роста	7,76±0,54	7,54±0,52	1,96±0,24
Начало стационарной фазы	8,56±0,42	8,25±0,39	2,49±0,19
Конец стационарной фазы	8,20±0,12	8,30±0,46	2,52±0,24
Фаза старения	7,32±0,31	6,86±0,42	2,36±0,22

Таким образом, можно считать установленным, что активным продуцентом витаминов B₃, B₆ и B₁₂ в сложном биоценозе, осуществляющем анаэробное расщепление органических веществ, являются стрептококки, относящиеся к виду *Str. bovis*.

Между отдельными видами микробной популяции рубца жвачных животных существует тесная симбиотическая связь, которая в значитель-

ной степени определяется взаимным витаминным снабжением. В то время как одни виды микроорганизмов для нормального роста и развития нуждаются в поступлении определенных витаминов в клетку извне, другие являются продуцентами этих веществ, выделяют их в окружающую среду и снабжают витаминами не только микробов-симбионтов, но и организм животного-хозяина. О механизме аккумуляции отдельных витаминов в клетках бактерий известно очень мало. Хотя считают, например, что клетки штаммов *L. leichmanii* и *L. delbrueckii*, нуждающиеся в витамине В₁₂, поглощают его из среды в количестве 0,5 мкг/г сухого вещества. При этом почти весь витамин обнаруживался во фракции клеточных стенок, очевидно, связываясь с находившимся там полипептидом.

Как видно из таблицы 8, аукогетеротрофы могут аккумулировать в клетках определенные количества витаминов при выращивании их на средах с большим содержанием витаминов, чем это необходимо для роста бактерий (так называемое "избыточное потребление" витамина).

Таблица 8. Интенсивность использования витаминов группы В из среды ассоциатом аукогетеротрофов

Витамины	Концентрация витаминов в среде, мкг/100 мл		%	Содержание витаминов в клетках, мкг/г
	до инкубации	после инкубации		
В ₃	17	7,8±0,54	46	0,43
В ₆	7	3,5±0,27	50	0,52
В ₁₂	5	2,3±0,12	46	0,60

Заключение

Приведенные нами экспериментальные данные показали, что витамины В₃, В₆ и В₁₂ обнаруживаются как в биомассе бактерий, так и в культуральной жидкости. При этом следует заметить, что в ряде новых наблюдений, выполненных нами, получены дополнительные сведения, подтверждающие, что микрофлора рубца обладает различной витаминсинтезирующей активностью. Так, установлено, что штаммы одних видов микроорганизмов синтезируют значительные количества различных витаминов группы В, а другие - только отдельные из них. Максимальное количество витаминов обнаруживается до начала старения культур и находится в прямой зависимости от уровня и соотношения углеводов и азота в среде. На интенсивность синтеза витаминов существенное влияние оказывает также источник углевода в среде.

По нашему мнению в перспективе витаминсинтезирующие бактерии можно будет использовать для получения на их основе пробиотических препаратов. Так, например, нами показано, что дача телятам с профилактической целью препарата из *Str. bovis* с высокой витамин В₁₂ – биосинтетической активностью, обеспечивает формирование в пищеварительном тракте нормального микробиоценоза, снижает заболеваемость животных диспепсией и сокращает продолжительность болезни (Долгов, Долгова, 2000).

Полученные данные могут послужить основой для продолжения исследований, необходимых при оценке витаминного статуса животных разной продуктивности, а также в целях создания интегрального теста субстратной оценки кормов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина, 1982: 78.
2. Долгова С.И., Долгов И.А., Заболотнов Л.А. Биосинтез и использование пантотеновой кислоты у лактирующих коров при разных условиях питания. 3-я Межд. конф. Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Боровск, 6-8 сент. 2000: 151-158.
3. Долгов И.А. Выделение, культивирование и определение амилазной активности крахмалгидролизующих бактерий рубца жвачных. В сб.: Изучение микрофлоры преджелудков у жвачных (Методические указания), Боровск, 1977: 36.
4. Долгов И.А., Долгова С.И. Влияние *Str. bovis* на биоценоз кишечника телят. Сб. труд. ВНИИФБиП с.-х. животных, 2000, 39: 321--326.
5. Заварзин Г.А. Определитель бактерий. Перевод с англ. Изд.: Мир. 1997.
6. Мейсель М.Н. Витамины и микроорганизмы. Успехи биологической химии, 1952, 11, 4: 390.
7. Bryant M.P., Burkey L.A. Cultural methods and some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. J. Dairy Sci., 1953, 36, 3: 205.
8. Dryden L., Hartman A., Bryant M. et al. Production of vitamin B₁₂ and vitamin B₁₂ analogues by pure cultures of ruminal bacteria. Nature, 1962, 195, 4837: 201.
9. Gutierrez J. Numbers and characteristics lactate utilizing organisms in the rumen of cattle. J. Bacteriology, 1953, 66, 2: 123.
10. Hungate R.E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. J. Bacteriol. Rev., 1950, 14, 1: 1-49.
11. Nurmikko V. Symbiosis experiments concerning the production and biosynthesis of certain amino acid and vitamins in associations of lactic bacteria. Acta Acad. Sci. Fennica, 1954, Ser. A, 54: 7-58.
12. Scardovi V. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Baltimore, 1986, 2: 1418-1434.

ВЛИЯНИЕ ОПТИМИЗАЦИИ УРОВНЯ И КАЧЕСТВА ОБМЕННОЙ ЭНЕРГИИ В РАЦИОНАХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ И В ЭНЕРГЕТИЧЕСКОМ ОБМЕНЕ У ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ

В.И. Агафонов, В.Б. Решетов, В.П. Волобуев, В.П. Лазаренко, А.Б. Чугреев
Лаборатория энергетического питания

На фоне сбалансированных по принятым нормам рационов лактирующим коровам инфузировали казеин и отдельные субстраты в количестве 4,5 МДж и 6,0 МДж или совместно пропионат и казеин (10 МДж). Установлено положительное влияние на удой и калорийность суточного удоя у коров инфузии в рубец ацетата (на 11,35% и 11,58% соответственно), по сравнению с контрольным периодом. Инфузии пропионата в рубец, хотя и незначительно, повышали удой (на 2,62%), но снижали калорийность суточного удоя (на 1,30%) по сравнению с результатами балансового опыта. В заключительный период лактации получен положительный эффект при инфузии казеина. Сделан вывод о целесообразности оптимизации рационов с учетом вклада основных субстратов в формирование обменной энергии.

Введение

Определение количества образующихся в желудочно-кишечном тракте доступных для усвоения субстратов (ацетата, пропионата, бутирата, аминокислот, высших жирных кислот, глюкозы) необходимо для оценки эффективности их использования в энергетическом обмене и на биосинтез (Агафонов и др., 1995, 1999, 2001). В этом заключается основное преимущество субстратной характеристики обменной энергии рационов, по сравнению с традиционной оценкой их по содержанию обменной энергии и основным группам сырых питательных веществ, характеризующих состав корма (Калашников, 1995). Пока еще не накоплено данных для определения потребности коров в отдельных субстратах. Для этого необходимо обоснование наиболее рациональных биохимических путей синтеза компонентов молока, обусловленное одновременно и низкими энергетическими затратами.

Нами установлены закономерности, свидетельствующие о существенном снижении доли ацетата в суточной теплопродукции у коров в начальный период лактации (Агафонов и др., 2000). Ввиду универсальной взаимозаменяемости субстратов в энергетическом обмене трудно опреде-

лить их оптимальное сочетание у молочных коров по фазам лактации и в сухостойный период. Однако, именно от этих комбинаций субстратов зависит конечная эффективность обеспечения энергией основных функций и процессов биосинтеза в животном организме.

В плановых исследованиях на лактирующих коровах проводили оценку фонда субстратов, доступных для усвоения, образующихся в желудочно-кишечном тракте и используемых на энергетические нужды и на биосинтез.

Целью проведенных исследований являлось обоснование оптимальных вариантов структуры обменной энергии, обеспечивающих высокую эффективность ее использования.

Материал и методы

Исследования проведены на 2 коровах-первотелках холмогорской породы в период 40-90 дней лактации и в заключительный период лактации. Коровы были подготовлены к опыту с наложением фистул рубца и двенадцатиперстной кишки.

На фоне сбалансированных по принятым нормам (Калашников, 1995) рационов проводили дополнительные инфузии ацетата и пропионата – в рубец; казеината натрия – в двенадцатиперстную кишку. Количество инфузируемых субстратов – 5% от обменной энергии рациона в сутки, в течение 5 суток. Субстраты предварительно растворяли в воде в объеме 12 литров; продолжительность инфузии – 12 часов в сутки.

Сопоставление полученных результатов проводили с показателями балансовых опытов, проведенных в период 60-64 дней лактации и в период завершения лактации.

В каждом периоде определяли потребление сухого вещества корма, молочную продуктивность коров, калорийность суточного удоя и калорийность 1 кг молока. Кроме того, для расчета эффективности использования обменной энергии определяли величины суточной теплопродукции с учетом дыхательного коэффициента, а также потери энергии с мочой.

Основной рацион состоял из сена злаковых многолетних трав, силоса злаково-бобовых многолетних трав и полноценного комбикорма (табл. 1). Питательность рациона рассчитывали по принятым показателям и по количеству субстратов, доступных для усвоения.

Таблица 1. Рационы кормления коров

Корма, показатели питательности рационов	Ед. изм	Коровы первого отела, 40-90 дн. лакт., ж.м. 420 кг, удой 15-17 кг	Коровы в конце лактации, ж.м. 420 кг, удой 6-8 кг
Сено злаковое	кг	3,8	3,8
Силос зл.боб.мн.трав	кг	20,0	14,6
Комбикорм	кг	6,0	4,5
В рационах содержалось:			
Обменная энергия	МДж	121	90
Сухое вещество	кг	13,94	11,29
Сырой протеин:	г	1806	1462
в т.ч. распадаемый	г	1250	990
нераспадаемый	г	556	472
Целлюлоза	г	2171	2109
Гемицеллюлоза	г	2742	2500
Лигнин	г	913	711
Крахмал	г	2540	1870
Сахар	г	450	370
Сырой жир	г	387	273

Результаты и обсуждение

Инфузии ацетата в рубец оказали положительное влияние на удой (11,35%) и калорийность суточного удоя (15,79%), по сравнению с предварительным периодом (табл. 2).

Таблица 2. Влияние инфузии ацетата на обмен энергии и молочную продуктивность коров

№ коров	Суточный удой, кг	Энергия суточного удоя, МДж	Калорийность 1 кг молока, МДж	Суточная теплопродукция, МДж	Дыхательный коэффициент	Потери энергии с мочой, МДж/сут
Предварительный период						
1	14,8	43,4	2,930	50,9	0,738	не учт.
2	13,4	40,2	3,000	52,5	0,816	не учт.
Среднее	14,1	41,8	2,965	51,7	0,777	-
Инфузия ацетата в рубец						
1	17,0	51,7	3,041	47,0	0,795	9,5
2	15,0	45,1	3,007	53,4	0,888	8,6
Среднее	16,0	48,4	3,024	50,2	0,842	9,05

В последующие три периода провели инфузию пропионата в рубец (56-60 дней после отела) и балансовый опыт без инфузий (61-64 дней после отела).

Инфузия пропионата сопровождалась незначительным (2,62%) повышением суточного удоя, однако калорийность суточного удоя и 1 кг молока снижались на 1,30% и 3,78%, соответственно, по сравнению с периодом проведения балансового опыта (табл. 3).

Таблица 3. Влияние инфузии пропионата на обмен энергии и молочную продуктивность коров

№ коров	Суточный удой, кг	Энергия суточного удоя, МДж	Калорийность 1 кг молока, МДж	Суточная теплопродукция, МДж	Дыхательный коэффициент	Потери энергии с мочой, МДж/сут
Инфузия пропионата						
1	16,6	47,4	2,855	46,9	0,855	7,0
2	14,7	43,8	2,980	53,4	0,940	7,4
Среднее	15,65	45,6	2,918	50,15	0,898	7,2
Балансовый опыт (без инфузий)						
1	16,6	50,3	3,030	50,9	0,901	8,5
2	13,9	42,1	3,029	52,55	0,897	7,0
Среднее	15,25	46,2	3,030	52,55	0,897	7,0

В период 75-79 дней и 80-84 дня лактации проведены два сравнительных опыта: с инфузией казеина и в сочетании инфузии казеина в двенадцатиперстную кишку и пропионата в рубец (табл. 4).

Таблица 4. Влияние инфузии казеина и пропионата на обмен энергии и молочную продуктивность коров

№ коров	Суточный удой, кг	Энергия суточного удоя, МДж	Калорийность 1 кг молока, МДж	Суточная теплопродукция, МДж	Дыхательный коэффициент	Потери энергии с мочой, МДж/сут
Инфузия казеина						
1	15,8	43,9	2,779	46,7	0,876	7,5
2	14,2	40,6	2,859	53,65	0,884	7,5
Среднее	15,0	42,25	2,819	53,65	0,884	7,5
Инфузия казеина и пропионата						
1	16,6	45,5	2,701	50,1	0,926	8,7
2	14,2	41,9	2,951	64,4	0,791	7,8
Среднее	15,4	43,7	2,826	57,25	0,859	8,25

Молочная продуктивность коров при инфузии казеина с пропионатом повысилась на 2,67%, калорийность суточного удоя – на 3,43% по сравнению с инфузией одного казеина. Более выражено было повышение суточной теплопродукции (на 6,71%).

С целью изучения обмена энергии и продуктивности у коров в период завершения лактации при инфузии ацетата и казеина, исследования провели на 2 коровах-первотелках с удоем 6,8 кг/день. В качестве контроля использовали данные балансового опыта, где были установлены исходные показатели по молочной продуктивности (6,8 кг молока в сутки), по калорийности суточного удоя (20,10 МДж), по отложению энергии в приросте (16,20 МДж/сутки) и по уровню теплопродукции (54,45 МДж/сутки) (табл. 5).

Таблица 5. Балансы энергии у коров при использовании основных рационов, МДж/сут

Показатели	Периоды лактации			
	60-64 дней лактации		заключительный период лактации	
	№ 1	№ 2	№ 1	№ 2
Валовая энергия корма	227,6	223,7	180,8	185,6
Содержание энергии в кале	89,4	77,4	64,6	67,6
Энергия переваримых питательных веществ	138,2	146,3	116,2	118,0
Потери энергии в желудочно-кишечном тракте	24,3	25,7	20,5	20,8
Суммарная энергия субстратов	113,9	120,6	95,7	97,2
Содержание энергии в моче	8,5	5,5	6,3	5,1
Обменная энергия	105,4	115,1	89,4	92,1
Теплопродукция	50,9	54,2	54,6	54,3
Энергия удоя	50,3	42,1	20,2	20,0
Отложение энергии в теле	+4,2	+18,8	+14,6	+17,8

Инфузия ацетата в рубец в количестве 4,5 МДж/сутки не вызвала изменений в уровне молочной продуктивности, однако при этом отмечена тенденция к снижению калорийности молока. Одновременно на 4,75% повысилась теплопродукция, но без изменений величины дыхательного коэффициента. В целом эффективность использования обменной энергии на продукцию (молоко и прирост массы тела) при этом снизилась.

Инфузия казеина в двенадцатиперстную кишку в количестве 4,5 МДж на голову в сутки сопровождалось повышением молочной продук-

тивности на 1 кг/сутки; калорийность суточного удоя – на 20,05%; калорийности 1 кг молока – на 3,58%. Одновременно на 7% снизилась теплопродукция и, следовательно, повысилась эффективность использования обменной энергии на продукцию.

В основных рационах для коров 40-90 дней лактации и в период завершения лактации балансирование по энергии, питательным и биологически активным веществам проводили по принятым рекомендациям (Калашников, 1995). Общие показатели питательности рационов представлены в таблице 6. Обменная энергия приведена в абсолютных показателях, рассчитан фонд субстратов, доступных для усвоения.

Таблица 6. Энергетическая и субстратная питательность рационов

Показатели	Ед. изм.	40-90 дней лактации, ж.м. 357 кг, удой 15-17 кг	Завершение лактации, ж.м. 420 кг, удой 6-8 кг
Обменная энергия	МДж	121	90
Фонд доступных для усвоения субстратов			
Ацетат	г	3135	2570
Пропионат	г	1090	687
Бутират	г	570	357
Сумма аминокислот	г	1090	884
Сумма высших жирных к-т	г	325	230
Глюкоза	г	682	315
Молочная кислота	г	320	220

Дополнительные инфузии отдельных субстратов привели к изменению качественных и количественных показателей в структуре обменной энергии рационов (табл. 7).

Таблица 7. Вклад субстратов в структуру обменной энергии, %

Субстраты	Основной рацион	Инфузии			
		ацетат	пропионат	казеин	казеин + пропионат
	Коровы 40-90 дней лактации				
Ацетат	35,45	38,51	33,78	33,78	32,75
Пропионат	17,85	17,01	21,74	17,01	19,53
Бутират	10,91	10,39	10,39	10,39	10,08
Сумма аминокислот	16,20	15,43	15,43	20,16	19,54
Сумма высш. жирн.к-т	10,50	10,00	10,00	10,00	9,70
Глюкоза	9,09	8,66	8,66	8,66	8,40
Итого	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Продолжение таблицы 7

	Коровы в конце лактации				
Ацетат	41,11	43,92	-	39,15	-
Пропионат	15,72	14,97	-	14,97	-
Бутират	9,89	9,42	-	9,42	-
Сумма аминокислот	17,68	16,84	-	21,60	-
Сумма высш. жирн.к-т	5,63	5,36	-	5,37	-
Итого	100,00	100,00	-	100,00	-

В рационах лактирующих коров обменная энергия на 32,75-43,92% формируется за счет ацетата; на 14,97-19,53% – за счет пропионата; на 9,42-10,91% – за счет бутирата; на 15,43-21,60% – за счет аминокислот; на 9,49-10,50% – за счет высших жирных кислот; на 5,63-9,09% – за счет глюкозы. Инфузии отдельных субстратов изменяли соотношение по ацетату на 2,81-3,06%; по пропионату – на 3,89%; по аминокислотам – на 3,94-4,76% по сравнению с основным рационом. Таким образом, показаны физиологические лимиты варьирования структуры обменной энергии и возможные пути ее оптимизации за счет изменений соотношения кормовых средств.

Заключение

Разработанные методы инфузирования отдельных субстратов позволяют определить ответную реакцию на дополнительное, строго дозированное количество доступного для усвоения субстрата, на фоне сбалансированного по принятым нормам рациона.

Наиболее значительное влияние на молочную продуктивность коров оказывают инфузии казеина. Этот эффект известен и описан в исследованиях Ерскова (1983). Однако суммарное действие аминокислот в казеине в этих исследованиях не дифференцировано от лимитирующих факторов, влияющих на молочную продуктивность. В этом направлении необходимо продолжить исследования.

В сочетании инфузии казеина и пропионата предполагается одновременное повышение обеспеченности аминокислотами и энергией. Влияние пропионата связано с качественными изменениями в структуре обменной энергии. Однако действие пропионата на молочную продуктивность связано со снижением калорийности молока за счет снижения процента жира в молоке (Курилов, 1971). Увеличение доли пропионовой кислоты в рубцовой жидкости за счет увеличения крахмала в рационе может одновременно повысить образование глюкозы, если часть крахмала переваривается не в рубце, а в тонком кишечнике. Суммарное образование про-

пионата и глюкозы повышает их долю в составе обменной энергии до 20-28% у лактирующих коров (табл. 6). Таким образом, вводится новое трактование физиологического действия высококонцентратных рационов у коров на их продуктивность.

Представляет интерес установленное в опытах влияние инфузии ацетата на уровень молочной продуктивности в период 50-60 дней лактации, когда одновременно наблюдается повышение уровня молочной продуктивности и калорийности суточного удоя.

На уровне целостного организма показаны возможности регулирования молочной продуктивности и энергозатрат при дополнительной инфузии казеина, отдельных субстратов или их сочетания на фоне сбалансированного рациона. По сравнению с контролем (предварительный период и балансовые опыты) теплопродукция у коров изменялась незначительно: при инфузиях ацетата снижение – на 2,91%, при инфузиях пропионата снижение – на 4,57%. При инфузии пропионата и казеина установлено одновременное повышение калорийности суточного удоя и теплопродукции.

Следовательно, установлены возможные пути совершенствования обеспеченности лактирующих коров обменной энергией с учетом варьирования уровня некоторых субстратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агафонов В.И. Нормирование энергии у жвачных животных по принципу субстратной обеспеченности метаболизма. Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Материалы 2 Междунар. конф. 5-8 сентября 1995г. Боровск, 1995: 87-93.
2. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П. и др. Обеспеченность субстратами энергетических процессов у коров при различных уровнях кормления и продуктивности. Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск. 1999, 38: 375-384.
3. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П. и др. Совершенствование системы энергетического питания молочного скота. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск. 2001, 40: 123-134.
4. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие (под ред. акад. А.П. Калашникова, Н.И. Клейменова и проф. В.В. Щеглова) М. Знание. 1995.
5. Агафонов В.И., Решетов В.Б., Волобуев В.П. и др. Особенности использования энергии корма у коров в начальный период лактации. Труды ВНИИФБиП с.-х. животных. Боровск. 2000, 39: 123-134.
6. Ерсков Э.Р. Протеиновое питание жвачных животных (пер. с англ.), М.: Агропромиздат. 1985.

7. Курилов Н.В., Кроткова А.П. Физиология и биохимия пищеварения жвачных. М., Колос, 1971.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ПЕЧЕНИ И МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ

А.В. Лысов

Лаборатория межуточного обмена

У коров в различные фазы лактации и в начальный период сухостоя исследовано содержание углеводно-липидных показателей в притекающей и оттекающей крови, определены количественные параметры использования метаболитов в молочной железе.

Введение

Специфический характер поглощения питательных веществ из притекающей к молочной железе крови у лактирующих коров свидетельствует о многочисленных факторах, влияющих на этот процесс, которые при индивидуальном анализе артериовенозной разности метаболитов вносят погрешности и некоторую неопределенность при количественной оценке использования питательных веществ. При анализе артериовенозной разности в молочной железе не учитываются многие факторы, и в том числе постоянство процессов формирования концентрации метаболитов в артериальной крови, что вносит существенные ошибки при индивидуальной краткосрочной количественной оценке.

В связи с этим в задачу наших исследований входило изучение зависимостей между концентрацией метаболитов углеводно-липидного обмена в притекающей и оттекающей от молочной железы крови у коров с различной продуктивностью, фазой лактации, уровнем кормления, то есть решалась задача нахождения достоверных взаимосвязей при условии значительных изменений содержания метаболитов в крови, с тем, чтобы по регрессионным уравнениям предсказать теоретическую и вероятностную артериовенозную разность по молочной железе, свободную от ошибок различного характера. При этом основной акцент исследований смещался на выявление у лактирующих коров достоверных зависимостей между концентрацией питательных веществ в притекающей и оттекающей крови, для получения цельной картины метаболизма субстратов в вымени, что важно

и для дальнейшего совершенствования системы питания молочных коров (Annison et al., 1974, Currie, 1972).

Объем кровотока молочной железы – один из главных показателей при количественном учете поглощения метаболитов из крови. Для исследования кровотока и количественного анализа потоков метаболитов, протекающих и оттекающих от исследуемого органа с кровью, мы применили один из современных методов его исследования – ультразвуковую флоуметрию. Целью наших работ было измерение объемного кровотока вымени коров в связи с затуханием лактации и получение данных по кровотоку вымени у коров в первую фазу сухостойного периода, что позволяло определить долю кровотока, необходимую для поддержания обменных процессов в молочной железе.

Материал и методы

Объемный кровоток молочной железы измеряли у коров, находившихся в запуске и во время сухостоя, непрерывно в течение двух суток. Ультразвуковой флоуметр оснастили самописцем TZ = 2004, совместимым с прибором регистрации кровотока, и использовали постоянно на протяжении всего периода измерения. Поза и поведение животного не влияли на качество измерений.

Результаты и обсуждение

Суточные измерения кровотока молочной железы у коров представлены в табл. 1.

Таблица 1. Суточная динамика артериального кровотока молочной железы у коров в период спада лактации и при сухостое, л/мин

Время суток, час	Суточный удой молока, л/сут		Сухостойный период
	5,0	3,7	
9	2,805±0,051	1,016±0,026	0,165±0,006
10	2,548±0,079	0,786±0,015	0,165±0,004
11	1,435±0,069	0,703±0,016	0,187±0,006
12	2,308±0,093	0,683±0,017	0,176±0,005
13	1,559±0,047	0,902±0,027	0,134±0,006
14	1,476±0,074	1,434±0,065	0,125±0,004
15	2,508±0,037	1,359±0,057	0,179±0,009
16	2,701±0,049	1,457±0,050	0,199±0,007

Продолжение таблицы 1

17	0,918±0,044	0,879±0,053	0,202±0,008
18	2,782±0,080	0,751±0,034	0,226±0,005
19	2,810±0,078	1,072±0,048	0,203±0,006
21	1,841±0,052	0,980±0,030	0,221±0,006
22	1,425±0,045	1,242±0,056	0,159±0,004
23	2,372±0,112	1,156±0,044	0,223±0,007
24	1,851±0,081	1,372±0,063	0,217±0,010
1	1,204±0,033	1,704±0,088	0,163±0,005
2	2,723±0,128	0,956±0,041	0,198±0,009
3	1,290±0,043	1,870±0,157	0,175±0,006
4	1,710±0,075	1,102±0,042	0,229±0,004
5	1,622±0,079	1,185±0,069	0,208±0,009
6	2,232±0,139	1,054±0,068	0,285±0,019
7	2,406±0,092	1,725±0,031	0,290±0,017
8	2,927±0,055	1,338±0,049	0,268±0,008

Кровоток молочной железы увеличивался после каждого кормления в 8, 14 и 19 часов и, по-видимому, связан с увеличением минутного объема сердца. В заключительной фазе лактации при запуске коров и суточном удое 5 л, на каждый литр секретируемого молока к молочной железе притекало 601,8 л крови, а при снижении суточного удоя до 3,7 л/сут – на каждый литр удоя притекало только 452 л крови. При анализе данных по кровотоку вымени в сухостойный период видно, что он снижался по сравнению с продуктивностью 5 л/сут в 8 – 10 и более раз.

Данные по концентрации ЛЖК в крови представлены в табл. 2. Как видно из таблицы, в крови воротной вены наблюдалась более высокая концентрация ЛЖК – 3,05±0,09мМ/л, далее в порядке снижения концентрации была кровь задней поллой вены после впадения печеночных вен, затем артериальная кровь, кровь задней поллой вены перед впадением печеночных вен, передней поллой вены, яремной вены и самая низкая концентрация ЛЖК была в крови молочной вены.

Таблица 2. Концентрация ЛЖК в крови различных сосудов у коров, мМ/л

Сосуды	Концентрация ЛЖК, мМ/л
Артерия	1,45±0,05
Воротная вена	3,05±0,09
Задняя полая вена перед печеночными венами	1,44±0,10
Задняя полая вена после печеночных вен	1,77±0,07
Передняя полая вена	0,95±0,02
Молочная вена	0,59±0,04
Яремная вена	0,83±0,03

Ежеминутно из пищеварительного канала в кровь воротной вены поступало 31,29мМ ЛЖК, за сутки 45,05 моля или 3076,6г. В отношении уксусной кислоты эти значения составили 18,18мМ/мин или за сутки 26,18 молей уксусной кислоты, что составляет 1570,5г. Пропионата поступало 12,86 молей или 951,6г, изомасляной кислоты 1320,69 мМ или 116,22 г, масляной кислоты 2695,54 мМ или 236,3 г. Эти данные, соотношенные с составом рациона, показателями продуктивности и физиологическим состоянием животных позволяют сделать вывод о выходе метаболитов в кровь животных из определенного набора субстратов кормов.

Данные, приведенные в табл. 3, характеризуют уровень ЛЖК в притекающей и оттекающей от вымени крови, кроме того на их основании устанавливается интенсивность поглощения ЛЖК молочной железой.

Таблица 3. Обмен ЛЖК в молочной железе у коров во вторую фазу лактации

Метаболиты	Показатели	Кровь молочной вены	Артериальная кровь	В-А разность
1	2	3	4	5
ЛЖК	мМ/л	0,59±0,04	1,45±0,05	-0,8603
	мМ/мин	5,0644	12,4684	-7,404
	мМ/сут	7292,8	17954,5	-10661,7
	г/сут	497,243	1218,11	-720,867
Уксусная кислота	мМ/л	0,36±0,0092	0,88±0,036	-0,5225
	мМ/мин	3,0443	7,5423	-4,498
	мМ/сут	2024,3	4853,3	-2829
	г/сут	263,03	651,65	-388,62
Пропионовая к-та	мМ/л	0,16707±0,0056	0,39226±0,014	-0,22519
	мМ/мин	1,4058	3,3703	-1,9645
	мМ/сут	2024,3	4853,3	-2829
	г/сут	149,8	359,14	-209,34
Изомасляная к-та	мМ/л	0,02105±0,0016	0,04407±0,0026	-0,02302
	мМ/мин	0,1803	0,3786	-0,1983
	мМ/сут	259,72	245,26	-285,54
	г/сут	22,85	44,98	-25,13
Масляная кислота	мМ/л	0,02844±0,0017	0,08062±0,005	-0,05218
	мМ/мин	0,2437	0,6927	-0,449
	мМ/сут	350,89	997,48	-646,59
	г/сут	30,88	87,78	-56,9
Изовалериановая к-та	мМ/л	0,00672±0,0003	0,01607±0,0012	-0,00935
	мМ/мин	0,0576	0,1380	-0,0804
	мМ/сут	82,91	198,83	-115,92
	г/сут	8,46	20,28	-11,82
Валериановая к-та	мМ/л	0,00879±0,0004	0,2025±0,0012	-0,01146
	мМ/мин	0,0753	0,1740	-0,0987

Продолжение таблицы 3				
Капроновая кислота	мМ/сут	108,45	250,55	-142,1
	г/сут	11,06	25,55	-14,49
	мМ/л	0,0078±0,0005	0,017931±0,001	-0,01013
	мМ/мин	0,0668	0,154	-0,0872
	мМ/сут	96,24	221,84	-125,6
	г/сут	11,163	25,73	-14,567

Исследования показали, что с повышением концентрации ЛЖК в артериальной крови В-А разница возрастает, т. е. молочная железа больше использует их в обменных процессах.

Данные таблицы 4 характеризуют картину изменения концентрации метаболитов от их поступления из кишечника (воротная вена) до поглощения молочной железой.

Таблица 4. Содержание метаболитов углеводного обмена в крови у коров

Показатели	Артерия	Воротная вена	Молочная вена
ЛЖК общие, мМ/л	1,45±0,05	3,05±0,09	0,59±0,04
Ацетат, мМ/л	0,878±0,036	1,805±0,051	0,355±0,009
Пропионат, мМ/л	0,392±0,014	0,849±0,029	0,167±0,005
Изо-бутират, мМ/л	0,0044±0,002	0,091±0,004	0,0021±0,0016
Бутират, мМ/л	0,081±0,005	0,0176±0,011	0,028±0,0017
Изо-валериат, мМ/л	0,016±0,0012	0,035±0,0021	0,0067±0,0003
Валериановая к-та, мМ/л	0,023±0,0012	0,0456±0,0028	0,0088±0,0004
Капроновая к-та, мМ/л	0,0179±0,001	0,0408±0,0033	0,042±0,0005
Глюкоза, мг%	55,9	54,8	50,9
Лактат, мг%	11,67	11,23	10,71
Пировиноградная к-та, мг%	0,725	0,784	0,697

Отдельные исследователи считают, что энергетический потенциал глюкозы, образовавшейся в кишечнике из крахмала, приближается к энергетическому потенциалу летучих жирных кислот (ЛЖК), так как около 30% скармливаемого крахмала переходит из преджелудков в следующие отделы пищеварительного тракта в неферментированном виде. Это дает возможность, манипулируя крахмалом с различной степенью переваривания, оказывать влияние на обмен глюкозы, а через нее и на энергетический обмен.

Известно, что общие липиды постоянно поступают из желудочно-кишечного тракта в кровь, затем трансформируются в печени и включаются в межклеточный обмен веществ. Содержание общих липидов в плазме воротной и артериальной крови в условиях опыта колебалась в пре-

делах 224,85 – 379,79 мг% и 228,15 – 362,59 мг% соответственно, т.е. во всех исследуемых отрезках времени уровень общих липидов в портальной крови превосходил таковой в артериальной ($r = 0,71$).

При минимальной концентрации (238,95 мг%) общих липидов в артериальной крови В-А разность была максимальной – (18,95 мг%) (табл. 5) (Kronfeld, 1969).

Таблица 5. Содержание общих липидов в крови воротной вены, артериальной крови и их артериовенозная разность, мг%

Воротная вена	Артерия	В-А разность
238,95	220	18,95
256,08	240	16,08
273,21	260	13,21
290,35	280	10,35
307,48	300	7,48
324,61	320	4,61

С увеличением концентрации общих липидов в артериальной крови В-А разность закономерно уменьшалась. Зависимость между содержанием общих липидов в крови воротной вены и в артериальной крови можно описать уравнением:

$$Y = 50,50049 + 0,85661 * X \quad (r=0,71; n=12),$$

где X - концентрация общих липидов в артериальной крови.

Зависимость содержания триацилглицеролов в портальной крови от их содержания в артериальной крови подчинялась уравнению:

$$Y = 5,23096 + 0,71487 * X \quad (r=0,52; n=12),$$

где X – концентрация триацилглицеролов в артериальной крови.

При концентрации триацилглицеролов в артериальной крови – 0,157 г/л, желудочно-кишечный тракт поглощал – 0,022 г/мин, а при концентрации 0,147 г/л стенка желудочно-кишечного тракта пополняла циркулирующую кровь триацилглицеролами со скоростью 0,027 г/мин. Таким образом, стенка желудочно-кишечного тракта в зависимости от концентрации триацилглицеролов в артериальной крови, поглощала и отдавала в кровь триацилглицеролы.

В таблице 6 показано распределение концентраций основных классов липидов плазмы крови по магистральным сосудам организма животных.

Таблица 6. Классы липидных соединений в плазме крови коров, мг%

Сосуды	Фосфолипиды	Триацилглицеролы	Эфиры холестерола	Свободный холестерол
АР	126,51±7,07	23,81±2,61	108,12±21,06	9,09±1,66
ВВ	124,41±8,62	22,02±3,19	118,28±24,27	10,28±2,42
ЗП2	166,30±21,06	23,71±3,33	108,58±15,11	8,70±0,85
ЗП3	132,61±4,77	25,92±2,35	129,41±15,89	10,63±0,79
ПП	126,09±7,58	24,04±3,08	113,26±24,31	9,35±1,67
МВ	129,54±7,24	20,75±3,06	115,05±26,38	10,34±2,37
ЯВ	123,65±6,68	23,91±2,52	111,39±20,38	9,09±2,37

Примечание: АР- артерия; ВВ – воротная вена; ЗП2 – задняя полая вена до впадения печеночных вен, а ЗП3 – после впадения печеночных вен; ПП – передняя полая вена; МВ – молочная вена; ЯВ – яремная вена.

В среднем за сутки, по расчетным данным, желудочно – кишечным трактом лактирующей коровы используется до 27,37 г НЭЖК.

Установлена линейная зависимость содержания НЭЖК в крови воротной вены от их содержания в артериальной крови ($r = 0,86$, $P < 0,001$). Венозно-артериальная разность по концентрации метаболита в исследуемых сосудах была отрицательной и возрастала от 2,50 до 14,86 мкмоль/л, при варьировании концентрации их в плазме артериальной крови от 55,0 до 200,0 мкмоль/л, что свидетельствует о том, какой процесс – липолиз или липогенез превалирует в данный момент в организме (табл.7) (Медведев, 1978).

Таблица 7. Венозно-артериальная разность по содержанию НЭЖК в плазме крови воротной вены и артерии, мкмоль/л

Артерия	Молочная вена	АВР
50,0	47,50	-2,50
70,0	65,84	-4,15
90,0	84,20	-5,80
110,0	102,55	-7,45
130,0	120,90	-9,10
150,0	139,26	- 10,74
170,0	157,61	- 12,39
190,0	175,96	- 14,04
200,0	185,14	- 14,86

Среднесуточный приток кетоновых тел с артериальной кровью составил - 1,02 г/мин, по воротной вене – 1,04 г/мин. Из желудочно-кишечного тракта в кровь воротной вены поступало 0,02 г/мин или 34,13 г/сутки кетоновых тел, в том числе 96% бета-оксимасляной кислоты от общего количества кетоновых тел.

Суммарно к печени доставлялось 1,32 г/мин кетоновых тел, в том числе по воротной вене – 1,05 г/мин. У лактирующих коров из печени в кровь поступало 0,46 г/мин, печени удерживалось 0,85 г/мин или 64,6%, т.е. две трети притекающих кетоновых тел (табл. 8) (Заболотнов, 1999).

Таблица 8. Потоки кетоновых тел и их баланс по печени, г/мин

В-А разность по воротной вене	Сумма притекающих кетоновых тел к печени	Поток кетоновых тел из печени	Поглощение печенью	Поток по печеночной артерии	Поток по воротной вене
0,02374	1,3116	0,464	-0,847	0,2617	1,0498

Среднесуточная концентрация кетоновых тел составила в артериальной крови 5,47 мг% и 4,11 мг% в передней полой вене. Между содержанием кетоновых тел в обоих сосудах наблюдалась достоверная положительная коррелятивная взаимосвязь ($r = 0,460$, $P < 0,02$).

В исследованиях выявлено значительное варьирование концентрации метаболитов крови у коров. Так, концентрация глюкозы в притекающей крови изменялась с 38,7 до 65,0 мг%, а в оттекающей крови - с 29,0 до 65,0 мг%. Более чем в 2 раза варьировали минимальные и максимальные значения концентрации ЛЖК и бета-оксимасляной кислоты в притекающей и оттекающей крови вымени коров. Различия между концентрацией метаболитов в артериальной крови и крови молочной вены достоверны ($P < 0,0001$), что свидетельствует об их активном метаболизме в молочной железе (таблица 9).

Артериовенозная разность глюкозы по молочной железе составляла в среднем 8,94 мг%, триацилглицеролов – 1,19 мг%, суммы ЛЖК – 0,86 мМ/л, ацетата - 0,62, пропионата – 0,17, прочих ЛЖК – 0,08 мМ/л и бета-оксимасляной кислоты – 1,27 мг%. При этом триацилглицеролов адсорбировалось из артериальной крови – 16,3, глюкозы – 16,4, бета-оксимасляной кислоты – 24,0, ЛЖК в сумме – 58,0, ацетата – 58,6, пропионата – 59,1%. Эти показатели соответствуют среднестатистическим значениям метаболитов в артериальной крови лактирующих коров.

Таблица 9. Концентрация метаболитов углеводно - липидного комплекса в притекающей – оттекающей крови молочной железы лактирующих коров

Метаболит	A: B	M±m	Min	Max
Глюкоза, мг%	A	49,89±0,999	38,7	65,0
	B	41,69±1,123	29,0	65,0
Триацилглицеролы, мг%	A	25,75±0,332	18,8	37,5
	B	21,56±0,286	12,5	27,5
Сумма ЛЖК, мМ/л	A	1,47±0,041	0,90	2,34
	B	0,62±0,014	0,44	0,89
Ацетат, мМ/л	A	1,052±0,036	0,56	1,56
	B	0,436±0,016	0,24	0,71
Пропионат, мМ/л	A	0,282±0,016	0,13	0,61
	B	0,116±0,006	0,04	0,19
Бета-оксимасляная кислота, мг%	A	5,292±0,231	2,00	8,50
	B	4,026±0,177	2,00	6,50

Теоретически ожидаемую артериовенозную разность в зависимости от концентрации метаболитов в артериальной крови лактирующих коров рассчитывали на основе регрессионного анализа.

Зависимость концентрации глюкозы в крови молочной вены от ее концентрации в артериальной крови достоверна ($r = 0,85$) и отражена в уравнении:

$$\text{ГлМв} = 13,473 * \text{EXP}(0,0228 * \text{ГлА}) \quad (r=0,82; n=12),$$

$$\text{АВРГл} = \text{Агл} - \text{ГлМв}$$

где ГлМв и ГлА – концентрация глюкозы соответственно в крови молочной вены и артериальной крови, мг%; АВРГл – артериовенозная разность содержания глюкозы в молочной железе, мг%.

При этом коэффициент адсорбции глюкозы в молочной железе из артериальной крови закономерно снижался с 18,4 до 13,5% по мере повышения концентрации глюкозы в артериальной крови с 44 до 62 мг%. Наиболее высокая артериовенозная разность глюкозы (9,12мг%) отмечена при концентрации последней в артериальной крови 53мг%. При этом коэффициент ее адсорбции в молочной железе составлял 17,2%, что на 1,2% ниже максимального значения. Следовательно, максимальная артериовенозная разность не соответствует оптимальному состоянию молочной железы по критерию адсорбции в ней глюкозы из артериальной крови.

Зависимость концентрации триацилглицеролов в крови молочной вены от их концентрации в артериальной крови достоверна ($r = 0,39$) и может быть представлена следующим уравнением:

$$\text{ТрМв} = 12,8223 + 0,33927 * \text{ТрА} \quad (r=0,39; n=12),$$

где ТрМв и ТрА – концентрация триацилглицеролов соответственно в крови молочной вены и артериальной крови, мг%.

Наиболее высокая артериовенозная разность триацилглицеролов (12,28 мг%) отмечена при максимальной его концентрации в артериальной крови.

Взаимосвязь ($r = 0,64$) концентраций бета-оксимасляной кислоты в крови молочной вены и в артериальной крови отражает следующее уравнение:

$$\text{БоМв} = 1,99351 * \text{EXP}(0,12339 * \text{БоА}) \quad (r=0,64; n=12),$$

где БоМв и БоА – концентрация бета- оксимасляной кислоты соответственно в крови молочной вены и артериальной крови, мг%.

Наиболее высокая артериовенозная разность бета-оксимасляной кислоты (2,81мг%) отмечена при максимальной ее концентрации в артериальной крови.

Зависимость концентрации ацетата в крови молочной вены от его концентрации в артериальной крови достоверна ($r = 0,71$) и может быть описана уравнением:

$$\text{АцМв} = 0,11015 + 0,30929 * \text{АцА} \quad (r=0,71; n=12),$$

где АцМв и АцА – концентрация ацетата соответственно в крови молочной вены и артериальной крови, мМ/л.

Коэффициент адсорбции ацетата в молочной железе из артериальной крови закономерно повышался с 49,00 до 61,96% по мере повышения концентрации ацетата в артериальной крови с 0,55 до 1,55 мМ/л. Наиболее высокая артериовенозная разность ацетата (0,961 мМ/л) отмечена при максимальной его концентрации в артериальной крови.

Зависимость концентрации пропионата в крови молочной вены от его концентрации в артериальной крови достоверна ($r = 0,76$) и может быть представлена уравнением:

$$\text{ПрМв} = 0,30946 * \text{ПрА} * 0,79205 \quad (r=0,71; n=12),$$

где ПрМв и ПрА – концентрация пропионата соответственно в крови молочной вены и артериальной крови, мМ/л.

Наиболее высокая артериовенозная разность пропионата (0,361 мМ/л) отмечена при его максимальной концентрации в артериальной крови. Параметры адсорбции ЛЖК в молочной железе из артериальной крови не отличаются от таковых ацетата и пропионата и, по-видимому, в большей мере определяются этими кислотами.

Заключение

Таким образом, зависимость концентрации метаболитов углеводно-липидного комплекса в крови молочной вены от их концентрации в артериальной крови лактирующих коров носит генеральный характер, то есть она специфична и отражает основные закономерности метаболизма молочной железы. На основе массива полученных данных создана система уравнений, которая позволяет с высокой степенью достоверности рассчитывать концентрацию метаболитов в основных сосудах организма и на основании этого судить об обеспеченности. Кроме того, этой работой положено начало установлению количества метаболитов из определенных субстратов рациона, для чего часть питательных веществ рациона заменяли чистыми субстратами, непосредственно инфузируемыми животным. В настоящее время работы по установлению таких зависимостей продолжаются в физиологических опытах, а в дальнейшем рационы кормления, составленные на основе уточненных норм, будут апробированы в условиях хозяйств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Annison E.F., Bickerstaffe R. and J.L. Linsell. Glucose and fatty acid metabolism in cows producing milk of low fat content. *J. Agric. Sci.* 1974, Camb, 82:87
2. Currie W.B. Trans – lactation changes in the activities of selected enzymes in biopsy samples of the bovine mammary gland. *Austral. J. Biol. Sci.*, 1972, 25, 6: 1333- 1340.
3. Kronfeld D. S. Biosynthesis of milk constituents at lactogenesis. In *Lactogenesis: the initiation of milk secretion at parturition*, ed by Reynolds, M, and Folley, S.J. Philadelphia : Univ. Of Pennsylvania Press, 1969: 109-120.
4. Медведев И.К. О биосинтезе и секреции белков и жира молока у жвачных. Автореф. дисс. ...д. б. н., Боровск, 1978.
5. Заболотнов Л.А. с соавт. Метаболизм в молочной железе у лактирующих и сухостойных коров. В сб.: *Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных*. Боровск, 1999: 343-375.

ПОСТУПЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ И КЕТОНОВЫХ ТЕЛ ИЗ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА В КРОВЬ ПРИ РАЗЛИЧНОМ УРОВНЕ КРАХМАЛА В РАЦИОНАХ ЛАКТИРУЮЩИХ КОРОВ

*Л.Н. Вострова, А.Е. Шмельков, В.М. Мартюшов, А.В. Лысов,
Н.А. Гаранина, Д.Е. Панюшкин
Лаборатория межклеточного обмена*

*Получены количественные данные поступления глюкозы и кетон-
овых тел в кровь при разном уровне крахмала в рационе.*

Введение

При организации полноценного кормления молочных коров исключительно важное значение имеет рациональное использование комбикормов и зерна различных культур, т.к. в структуре рациона они составляют от 15 до 40%. По химическому составу зерно разделяют на богатые крахмалом (злаки) и богатые протеином (бобовые). В зерне злаков содержится до 70% углеводов, в основном крахмала, в бобовых лишь 20-30%. Крахмал и сахар являются главными компонентами, определяющими энергетическую ценность зерна и факторами, активно влияющими на синтез белка микроорганизмов. По литературным данным известно, что увеличение концентрированных кормов в рационах, качественный состав клетчатки (особенно при низком уровне концентратов в рационе) и способы обработки кормов значительно влияют на образование из крахмала в преджелудках летучих жирных кислот, которые, при всасывании в стенке рубца и, в основном, в печени, подвергаются дальнейшим превращениям. При повышенном образовании в рубце пропионовой кислоты, главного предшественника глюкозы в организме жвачных больше синтезируется глюкозы, при всасывании масляной и уксусной кислот идет образование кетонных тел.

Цель исследований – изучение количественных параметров всасывания глюкозы и кетонных тел из желудочно-кишечного тракта у лактирующих коров на 3-4 месяце лактации при различном содержании крахмала в рационах коров.

Материал и методы

Опыты проводили в виварии института на 3-х коровах холмогорской породы на 3-4 месяце лактации методом периодов.

Подопытные коровы были прооперированы по методике Заболотнова (1983) с выведением сонной артерии в пластиковую лодочку и приживлением на воротную вену ангиостомической канюли. Концентрацию кетоновых тел и глюкозы в крови воротной вены и сонной артерии определяли по общепринятым методикам (Райцис, Устинова, 1976). Пробы крови отбирали в периоды до кормления, через 2 и 5 часов после него.

Расчет количественного всасывания метаболитов из пищеварительного тракта в кровь проводили по математической модели, реализованной компьютерной программой «Метабол», используя данные объемной скорости кровотока в воротной вене.

Кормление и доение коров было трехразовым. Живая масса коров колебалась в пределах 457,0-488,5 кг. В рационах первых двух периодов опыта различным был уровень концентратов, в третьем периоде отсутствовала кормовая свекла и были уменьшены количества сена и силоса (см. табл.1), для получения более контрастных данных.

Данные экспериментов должны были выявить уровень всасывания метаболитов углеводно-липидного обмена в кровь воротной вены при высоком уровне концентратов и разном соотношении крахмала в рационах опытных групп. В I периоде опыта в рацион вводили 2 кг чистого картофельного крахмала, что соответствовало 20% ОЭ от начального содержания в рационе. Во II периоде опыта коровы получали на 1 кг крахмала меньше, что соответствовало 10% ОЭ от начального содержания в рационе. Таким образом, определяли влияние скармливания дополнительного количества картофельного крахмала в рационе на концентрацию глюкозы и кетоновых тел в крови воротной вены и артерии, а также на их количественное поступление в систему портальной крови.

Таблица 1. Рационы кормления опытных коров

Корма, кг	Периоды опыта		
	I	II	III
Сено разнотравное	4,5	4,5	4,0
Силос разнотравный	24,0	24,0	20,0
Свекла кормовая	10,0	10,0	--
Концентраты:	7,2	6,2	8,0
в т.ч. крахмал картофельный	2,0	1,0	--
В рационе содержится:			
к.ед.	17,19	15,48	14,53
ОЭ, МДж	190,11	173,45	148,93
Сухого вещества, кг	16,98	15,97	14,55

Продолжение таблицы 1

Сырого протеина, г	2828	2824	1963
Сырой клетчатки, г	3112	3093	2688
Крахмала, г	3000	1998	3906
Состав смеси концентратов, %			
Шрот соевый	48,6	56,4	-
Дерть ячменная	20,4	24,3	96,8
Крахмал картофельный	27,8	16,1	-
Соль	1,6	1,6	1,6
Трикальцийфосфат	1,6	1,6	1,6

Результаты и обсуждение

У коров на 3 месяце лактации, получавших 2 кг крахмала в составе концентратов рациона (20% по ОЭ),наблюдалось повышенное всасывание глюкозы в кровь портальной вены. Среднесуточная концентрация глюкозы в крови воротной вены и сонной артерии равнялась 49,97 и 47,45 мг%, соответственно, при поступлении глюкозы в систему портальной крови в количестве 743 г/сутки. Введение 2 кг крахмала в опытный рацион явилось нетипичной ситуацией для микрофлоры рубца. В этом случае изменились процессы ферментации в рубце и в кишечнике, отмечалась низкая амилолитическая активность содержимого рубца (данные лаборатории пищеварения), в результате чего существенные количества крахмала избегали переваривания в преджелудках. Поступивший в тонкий кишечник крахмал, и особенно в его тощий и подвздошный отделы, подвергался ферментативному гидролизу по влиянием ферментов панкреаса (Mills et.al.,1999). По данным Meisner et al.(1996), увеличение уровня крахмала в рационе приводило к пропорционально большему прохождению в тонкий кишечник химуса и повышало переваривание органического вещества до 15,2%. При инфузии крахмала в 12- перстную кишку Авебдах (1998) наблюдал повышение переваримости питательных веществ до 32% в тонком кишечнике.

Концентрация кетоновых тел в крови артериальной и воротной вены в среднем за сутки составляла 5,53 и 6,56 мг% соответственно. Артерио-венозная разность была отрицательной при коэффициенте поступления 0,116. За сутки в печень из ЖКТ поступало 158 г кетоновых тел, в том числе 144 г β -оксимасляной кислоты.

Через 2 часа после кормления концентрация глюкозы в крови воротной вены возросла на 11%, к 5 часам после кормления уровень ее в крови воротной вены достоверно снизился в 1,2 раза ($P < 0,01$) (табл.2). В первые часы после кормления переваривание шло за счет легкоферментируемых углеводов кормов рациона и гидролиза крахмала,

поступившего из преджелудков в кишечник. Рацион первого периода опыта обеспечивал также повышенный уровень кетоновых тел в крови воротной вены после кормления, особенно через 5 часов (табл.3). По данным Соловьева (1968), наряду с интенсивным всасыванием глюкозы отмечается повышенный кетогенез, так как глюкоза, поступающая из просвета желудочно-кишечного тракта, может использоваться в качестве энергетического вещества в его стенке. Это подтверждается нашими данными, когда поступление β -оксимасляной кислоты в кровь портальной вены находилось в большей отрицательной зависимости от глюкозы, притекающей к стенке пищеварительного тракта, нежели от глюкозы, поступающей из просвета ЖКТ ($r = -0,403$ против $-0,283$, $n=66$). Колебания уровня кетоновых тел в крови сонной артерии и воротной вены составили $5,27-6,11$ мг% и $5,52-6,53$ мг% соответственно, в том числе концентрации β -оксимасляной кислоты в пределах $4,31-5,16$ мг% и $4,65-5,64$ мг% (табл.3). Повышенное поступление крахмала с кормами рациона, по данным Курилова, Кротковой (1971) и Цюпко (1984), способствует поструминальному распаду крахмала в тонком кишечнике и всасыванию глюкозы в портальную систему крови.

Таблица 2. Концентрация глюкозы в крови коров в ранний период лактации при различном уровне крахмала в рационах, мг%

Точка отбора проб крови	Периоды опыта		
	I	II	III
	Уровень картофельного крахмала в рационе, кг		
	2	1	--
До кормления			
Артерия	48,04±1,32	47,36±2,28	50,91±0,79
Воротная вена	49,53±2,42	43,42±1,14	49,38±1,28
ABP	-1,49	+3,94	+1,54
Через 2 часа после кормления			
Артерия	48,80±1,07	49,39±1,94	50,17±0,12
Воротная вена	55,25±2,67	46,15±2,20	49,37±1,28
ABP	-6,45	+3,24	+0,80
Через 5 часов после кормления			
Артерия	46,47±1,38	40,45±1,48	49,26±0,61
Воротная вена	45,85±0,84	42,26±1,97	47,92±0,18
ABP	+0,62	-1,82	+1,34

В первом периоде опыта, при достаточном уровне энергетических субстратов в стенке ЖКТ, возрастал синтез β -оксимасляной кислоты в связи с повышенным образованием таких ЛЖК, как уксусная, изомасляная

и масляная кислоты. Всасывание ацетоуксусной кислоты в кровь портальной вены в первом периоде опыта было невысоким- 13,8 г/сутки, при коэффициенте поступления в кровь воротной вены 0,05, что по-видимому, связано с высокой активностью в эпителии рубца фермента оксibuтиратдегидрогеназы и насыщением тканей рубцовой стенки (в нашем опыте) энергетически богатыми метаболитами (такими как глюкоза), в результате чего происходило восстановление ацетоацетата до оксibuтирата (Курилов, Севостьянова, 1966), который поступал в кровь воротной вены.

Таблица 3. Концентрация суммы кетоновых тел в крови коров в ранний период лактации при различном уровне крахмала в рационах, мг%

Точка отбора проб крови	Периоды опыта		
	I	II	III
	Уровень картофельного крахмала в рационе, кг		
	2	1	--
До кормления			
Артерия	5,27±0,62	4,74±0,25	4,27±0,25
Воротная вена	5,52±0,80	5,44±0,62	4,90±0,82
ABP	-0,25	-0,70	-0,63
Через 2 часа после кормления			
Артерия	5,62±0,97	5,42±0,28	5,39±0,44
Воротная вена	6,50±0,47	5,37±0,61	4,72±0,64
ABP	-0,88	-0,05	+0,67
Через 5 часов после кормления			
Артерия	6,11±0,83	5,42±0,47	6,73±0,30
Воротная вена	6,63±0,13	6,01±0,35	7,32±1,68
ABP	-0,52	-0,59	-0,59

Рацион I-го периода опыта обеспечивал уровень продуктивности у коров, равный 23,5±0,82 кг молока в сутки, за счет повышенного поступления глюкозы и оксимасляной кислоты в кровь портальной вены, т.к. глюкоза на 60-70% используется на синтез лактозы молока, а β-оксимасляная кислота является предшественником жирных кислот молока. Во II периоде опыта коровы получали на 1 кг крахмала меньше (10% по ОЭ от начального содержания в рационе), продуктивность составила 22,9 кг молока сутки. Скармливание дополнительного количества крахмала (1 кг крахмала) повлияло на уровень глюкозы и кетоновых тел и их потоки по воротной вене. По данным нашей лаборатории поглощение ЛЖК в кровь воротной вены возросло, в том числе достоверно увеличилось поглощение уксусной, масляной и капроновой кислот. Если в I периоде опыта соотно-

шение таких ЛЖК как уксусная, пропионовая и масляная в крови составляло 75,4:13,5:11,1, то во II периоде соотношение кислот изменилось и составило 69,5:21,2:9,3, что свидетельствует о более полной переваримости крахмала именно в преджелудках с образованием пропионовой кислоты и поступлением ее в кровь портальной системы.

В таблице 2 показано, что во II периоде опыта глюкоза активно использовалась в стенке пищеварительного тракта при среднесуточной концентрации в крови артерии и воротной вены 45,73 и 44,37 мг% соответственно. Поступление кетонных тел уменьшилось до 100,33 г/сут при коэффициенте поглощения 0,08, в том числе за счет оксимасляной кислоты- до 74,55 г, против 144,27 г в I периоде. Повысилось также образование ацетоуксусной кислоты и ее всасывание в кровь портальной вены в 1,87 раза (25,77 г/с), что говорит о снижении уровня энергетически богатых метаболитов (в частности, глюкозы, которая интенсивно использовалась стенкой ЖКТ как источник энергии) при прохождении ЛЖК через стенку пищеварительного тракта в первые часы после кормления.

Таблица 4. Концентрация оксимасляной кислоты в крови коров в ранний период лактации при различном уровне крахмала в рационах, мг%

Точка отбора проб крови	Периоды опыта		
	I	II	III
	Уровень картофельного крахмала в рационе, кг		
	2	1	--
	До кормления		
Артерия	4,31±0,51	4,13±0,23	3,87±0,33
Воротная вена	4,65±0,56	4,53±0,37	4,00±1,00
АВР	-0,34	-0,40	-0,13
	Через 2 часа после кормления		
Артерия	4,69±0,93	4,40±0,18	4,65±0,45
Воротная вена	5,33±0,39	4,46±0,51	4,12±0,62
АВР	-0,64	-0,06	+0,53
	Через 5 часов после кормления		
Артерия	5,16±0,70	4,71±0,46	6,08±0,17
Воротная вена	5,64±0,24	5,15±0,28	6,12±1,22
АВР	-0,48	-0,44	- 0,14

Во II периоде опыта количество крахмала по отношению к комбикорму снизили до 16,1% , в результате чего среднесуточное поступление глюкозы было низким в связи с ее активным использованием в стенке преджелудков и тонкого кишечника. В период до кормления содержание глюкозы в крови артерии и воротной вены составило 47,36 и 43,42 мг%.

Высокий уровень извлечения глюкозы в периоды до и через 2 часа после кормления сменился поступлением ее в систему крови воротной вены через 5 часов после кормления (-1,82 мг%). Среднесуточное содержание глюкозы в крови воротной вены во II периоде опыта достоверно снизилось на 11% ($P < 0,05$) по сравнению с I периодом.

Концентрация β -оксимасляной кислоты в крови артерии и воротной вены составила 4,14-4,71 и 4,53-5,15 мг%, ацетоуксусной 0,61-1,02 и 0,86-0,91 мг% соответственно.

Через 2 часа наблюдалось резкое снижение поступления оксимасляной кислоты в портальную кровь и высокий уровень извлечения глюкозы из притекающей крови к стенке ЖКТ, в связи с всасыванием из преджелудков летучих жирных кислот и других метаболитов. Через 5 часов после кормления уровень оксимасляной кислоты повышался на 14% в крови обоих сосудов. Среднесуточное поступление оксимасляной кислоты снизилось в 1,94 раза по сравнению с I периодом опыта.

Во II периоде опыта поступление пропионовой кислоты в кровь воротной вены повысилось в 2,05 раза, что способствовало повышенному глюконеогенезу в печени и почках (Bines, Hart, 1984). Пропионовая кислота является главным предшественником глюкозы эндогенного происхождения. Поступление экзогенной глюкозы не оказывает сильного влияния на синтез эндогенной глюкозы в стенке преджелудков из пропионовой кислоты, но она, поступая в печень, может тормозить синтез кетонных тел из жирных кислот. Этим можно объяснить ингибирование процессов образования кетонных тел. По данным Bines, Hart (1984) пропионовая кислота, поступая в печень, является главным регулятором секреции инсулина. Инсулин, не оказывая прямого влияния на метаболизм в лактирующей молочной железе коров, изменяет скорость извлечения из крови и использование глюкозы и аминокислот в пользу жировой и мышечной тканей.

Во II периоде опыта наблюдалось также повышенное поступление в кровь воротной вены следующих ЛЖК: уксусной, изомасляной, капроновой и масляной по сравнению с I периодом. Для их прохождения через стенку ЖКТ требуется большой приток энергии в виде поступающей глюкозы. ЛЖК всасывались в большем количестве через 2 часа после кормления, в эти же периоды глюкоза активно извлекалась стенкой ЖКТ.

Таким образом, уменьшение в рационе коров во II периоде опыта картофельного крахмала на 1 кг по сравнению с I периодом опыта способствовало достоверному снижению поступления глюкозы из пищеварительного тракта в кровь воротной вены (на 11%), а так же снижению в

1,94 раза поступления оксимасляной кислоты и увеличению всасывания ацетоуксусной кислоты из пищеварительного тракта.

В III периоде опыта коровы получали с кормами рациона 3906 г крахмала ячменной дерти с включением минеральной добавки. Перевод лактирующих коров на рацион III периода снизил продуктивность до 16,7 кг молока в сутки, против 23,5 и 22,9 кг в I и II периодах. Соотношение ЛЖК в крови коров составило 71,5:22,0:6,5 при снижении уровня масляной кислоты. Поступление уксусной, пропионовой кислот в кровь воротной вены было выше в 1,18 и 2,02 раза, по сравнению с первым периодом. Поступление масляной кислоты уменьшилось в 1,4 раза, при этом возросло всасывание изовалериановой, валериановой и капроновой кислот по сравнению с I периодом. Повышение уровня указанных кислот в крови воротной вены в III периоде опыта было обусловлено изменением качества крахмала по сравнению с I и II периодами опыта и усилением пропионовокислого брожения в рубце, когда создаются условия для синтеза жирных кислот с разветвленной цепью в результате бактериального дезаминирования и декарбоксилирования (Алиев, Попова, 1969).

Концентрация глюкозы в крови артерии и воротной вены у коров в III периоде опыта равнялась 50,91-49,27 и 49,38-47,92 мг% (табл.2), кетоновых тел 4,24-6,73 и 4,90-7,32 мг% (табл.3), соответственно по сосудам. Содержание глюкозы в крови повысилось до уровня I периода опыта, при этом как до, так и после кормления. А-В разность была положительной по глюкозе (глюкоза извлекалась стенкой пищеварительного тракта).

Содержание кетоновых тел в крови артерии возросло через 2 часа после кормления в 1,26 раза (табл.3), через 5 часов наблюдалось достоверное увеличение кетоновых тел в крови артерии в 1,58 раза ($P < 0,01$) и воротной вены в 1,49 раза по сравнению с периодом до кормления. По данным А-В разности кетоновые тела извлекались одновременно с глюкозой через 2 часа после кормления стенкой ЖКТ. В периоды до и 5 часов после кормления кетоновые тела поступали в порталную кровь. Поступление β -оксимасляной кислоты резко снизилось по сравнению с предыдущими рационами (А-В разница = 0,13 мг% , против 0,40 и 0,34 мг% на 2 и 1 рационах в исходный периоды кормления).

В III периоде опыта в кровь воротной вены усилилось поступление ацетоуксусной кислоты до 40,52 г/сутки против 25,77 г и 13,79 г на 2 и 1 рационах, а поступление β -оксимасляной уменьшилось до 11,52 г/сутки, против 74,55 и 144,27 г в II и I периодах опытов, то есть, в стенке преджелудков создавались условия, когда пропионовая кислота при

прохождении через эпителий рубца превращалась в пировиноградную кислоту, далее в щавелевоуксусную. Увеличенное количество щавелевоуксусной кислоты улучшает использование уксусной кислоты в тканях и в результате ингибировался синтез кетонных тел, а также это происходило в связи с низким поступлением из преджелудков масляной кислоты.

Заключение

В 3-х периодах опыта при различных условиях кормления лактирующих коров, получены количественные параметры всасывания кетонных тел и глюкозы из пищеварительного тракта в кровь портальной вены. Изменение уровня кормления достигалось различным содержанием в рационах картофельного крахмала и других питательных веществ. В I периоде опыта, при содержании 2 кг картофельного крахмала в рационе, суточное поступление глюкозы и кетонных тел в кровь воротной вены составило 743 г и 153 г, в том числе β -оксимасляной кислоты -144 г. В II периоде, при содержании 1 кг картофельного крахмала, наблюдалось достоверное снижение концентрации глюкозы на 11% ($P < 0,05$) по сравнению с I периодом. Поступление кетонных тел в кровь воротной вены снизилось до 100 г в сутки. В III периоде опыта показан высокий уровень глюкозы в крови обеих сосудов. Поступление кетонных тел в кровь воротной вены, в связи с низким образованием масляной кислоты в преджелудках, уменьшилось до 52 г в сутки, в том числе β -оксимасляной кислоты до 11,5 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авебдах С.А.С. Процессы пищеварения и использования питательных веществ рациона бычками-кастратами при инфузии энергопротеиновых субстратов в тонкий кишечник. Автореф., дисс..., к.б.н., Дубровицы, 1998.
2. Алиев А.А., Попова Т.М.. Переваривание, усвоение и обмен липидов у жвачных животных (обзор). Сел. хоз-во за рубежом. Животноводство, 1969, 12.
3. Bines J., Hart I.C. The response of plasma insulin and other hormones to intraruminal infusion of VFA mixtures in cattle. Can. J. Anim. Sci., 1984, 64: 304-305.
4. Заболотнов Л.А. 1983 В кн.: Алиева А.А. Новейшие оперативные методы исследования жвачных животных. М. Агропромиздат. 1985, 114.
5. Курилов Н.В. Превращение углеводов в рубце жвачных. Вестник с.-х. науки, 1962, 2: 81-84.
6. Курилов Н.В., Кроткова А.П.. Физиология и биохимия пищеварения жвачных. М.: Колос, 1971.

7. Курилов Н.В., Севостьянова Н.А. Роль эпителия рубца в метаболизме летучих жирных кислот. Тр. ВНИИФБиП с.-х. жив., 1966, 3: 141-150.
8. Meissner H.H., Paulsmeier D.V., Leun K.J. Ruminant and postruminal digestion of dietary protein and starch in steers. S. Afr. J. Anim. Sci., 1996, 26, 3-4: 66-74.
9. Mills J.A.N., France J. and Dijkstra. A review of starch digestion in the lactating dairy cow and proposals for a mechanistic model: 2. Postruminal starch digestion and small intestinal glucose absorption. J. of Animal and Feed Sciences, 1999, 8: 451- 481.
10. Цюпко В.В. Физиологические основы питания молочного скота, 1984, К.: Урожай.
11. Райцис О.В., Устинова А.О. Методические исследования кормов, органов и тканей животных, 1976.
12. Соловьев А.М. Всасывание и обмен летучих жирных кислот и сахара рубцовой стенкой у овец. Автореф., дисс..., к.б.н., Боровск, 1968.

ВЛИЯНИЕ ИНФУЗИИ ЛЖК В РУБЕЦ НА ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ МОЛОЧНЫХ КОРОВ АМИНОКИСЛОТАМИ

Д.В. Карпов

Лаборатория белково-аминокислотного питания

Показано, что повышенная обеспеченность организма коров субстратами для метаболизма в начальный период лактации приводит к повышению эффективности использования аминокислот. Уточнены количественные характеристики поглощения отдельных аминокислот молочной железой коров при нагрузке субстратами. Нагрузка ацетатом и пропионатом методом инфузии в рубец рассматривается как тест для оценки обеспеченности организма коров аминокислотами.

Введение

Разрабатываемая в институте система питания высокопродуктивных коров, предполагающая обеспечение потребности в питательных веществах с учетом взаимодействия субстратов на уровне пищеварительного тракта и тканей, предусматривает установление потребности в отдельных субстратах, в том числе и аминокислотах, на основные функции организма. Применительно к лактирующим коровам предполагается поиск такого соотношения аминокислот и других питательных веществ в крови,

при котором идет наиболее эффективное образование молока. В свою очередь это должно быть обусловлено соответствующими рационами.

В кишечник жвачных поступает смесь аминокислот, представленная белком микрофлоры преджелудков, кормовым и эндогенным протеином. Микробный белок обеспечивает основное поступление аминокислот для организма животных, но высокопродуктивные коровы не могут удовлетворить продуктивные потребности в аминокислотах только за счет этого источника, поэтому возникает необходимость в скармливании таким животным белковых кормов, содержащих слабodeградируемые белки (Новая система..., 1989).

Обеспечение организма животных аминокислотами складывается из количества и соотношения аминокислот, поступающих из желудочно-кишечного тракта, и степени их усвоения организмом, что в свою очередь зависит от уровня кормления животных. Всасывание аминокислот из тонкого кишечника зависит от их уровня, а также от содержания в химусе минеральных веществ, витаминов, сахаров, липидов и др. веществ. Последние изменяют эндогенную секрецию аминокислот в пищеварительный тракт, их аккумуляцию и метаболизм в стенке кишечника, величину portalного кровотока (Курилов, 1987).

В меньшей степени изучены процессы использования аминокислот в молочной железе (Медведев, 1999; Merham, 1983). Известно, что более 50% энергетических потребностей, в том числе и на продукцию молока у коров, могут покрывать ЛЖК. Вместе с тем, при недостаточном обеспечении животных такими источниками энергии как ЛЖК, ВЖК и глюкоза, значительная часть аминокислот подвергается окислению, и тем самым использование аминокислот в продукционных процессах через синтез белка сдерживается. Окислительные процессы аминокислот начинаются уже при всасывании в стенке кишечника и тем самым снижается их поступление в portalную кровь. Основное всасывание ЛЖК происходит в преджелудках, но воздействие их на процессы поступления аминокислот из кишечника и их превращение возможно через артериальную кровь, уровень ацетата в которой значительно изменяется, поскольку он не полностью метаболизируется в печени.

В связи с этим основной задачей исследований было установить зависимость усвоения аминокислот и их использование в молочной железе у коров в первую фазу лактации при разном поступлении ЛЖК в организм животного, чтобы определить их оптимальный уровень.

Материал и методы

Для выполнения поставленной задачи методом периодов проведены физиологические опыты на 3-х коровах-первотелках холмогорской породы, со средней живой массой 400 кг в начале лактации в условиях вивария института, в комплексе с отделом питания.

Подопытные животные были хирургически подготовлены к опытам в период стельности путем выведения сонной артерии под кожу и наложения канюль на рубец и двенадцатиперстную кишку. После достижения пика продуктивности на фоне основного рациона животным периодами по 5 дней инфузировали через канюли желудочно-кишечного тракта растворы отдельных питательных веществ (субстратов) в течение 12 час/сут из расчета 5% от обменной энергии суточного рациона. Всего проведено 6 периодов, 2 из которых были контрольными, без введения субстратов.

Во все периоды эксперимента коровы получали рацион, включающий сено разнотравное 3,9 кг, силос разнотравный 21 кг и комбикорм 6 кг, что составляло по питательности 25, 25 и 50% соответственно.

В состав комбикорма были включены: ячмень - 45%, пшеница -20, овес - 12, шрот подсолнечниковый - 20, соль поваренная - 1, трикальций фосфат - 1 и премикс - 1%. Учитывали молочную продуктивность и поедаемость кормов. На 5-й день каждого периода у животных брали 3 раза в день пробы крови из сонной артерии и молочной вены с целью изучения уровня азотистых метаболитов - до кормления, и через 3 часа после утреннего и дневного кормления. Кормили коров в 8, 13 и 19 часов, содержали на привязи, поили - вволю из автопоилок.

В конце каждого периода в течение 2-х суток собирали мочу, а в основной контрольный период кроме того собирали кал для вычисления баланса азота и переваримости питательных веществ. Пробы кормов и молока анализировали на содержание общего азота и общих аминокислот, в пробах цельной крови определяли свободные аминокислоты, мочевины и глюкозу (Справочное пособие..., 1997).

Для вычисления критерия достоверности различий результатов применен разностный (парный) метод (Асатиани, 1965).

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов, когда на фоне основного рациона в рубец инфузировали растворы ацетата или пропионата, уровень молочной продуктивности повысился на 11,9 и 6,3% соответственно (табл.1).

Таблица 1. Показатели молочной продуктивности коров по периодам опыта

Показатели	Периоды опытов					
	первая серия			вторая серия		
	1 ОР	2 ОР+ацетат	3 ОР+про- пионат	4 ОР	5 ОР+казеин	6 ОР+казеин +пропионат
Удой, кг/сут	12,6±0,6	14,1±0,8	13,4±0,8	13,2±0,6	12,5±0,6	13,4±0,7
Содержание жира, %	3,45	4,19	3,84	3,34	3,47	3,64
Содержание протеина, %	3,27	3,17	3,46	3,21	3,21	3,07
Выделено жира с моло- ком, г/сут	432±57	590±65	514±83	440±73	434±60	488±54
Выделено протеина с молоком, г/сут	407±44	447±68	469±91	417±56	401±63	411±28

При этом введение ацетата в большей степени увеличило среднесуточное выделение липидов с молоком (+36,5%), а пропионата - синтез белков молока (+15,2%), хотя в этих случаях повысились значения обоих показателей. В оба периода опыта отмечено увеличение концентрации свободных аминокислот в артериальной крови животных, особенно после инфузии пропионата (+9,9) (табл.2). Это изменение произошло в основном за счет незаменимых аминокислот, а также серина и глицина. Вместе с тем, существенно увеличилась артерио-венозная разница по этим аминокислотам в молочной железе во 2-й и 3-й периоды опыта, что характеризует высокий уровень использования аминокислот крови в этом органе (табл.3, 4).

Таблица 2. Содержание свободных аминокислот в артериальной крови, мг%

Аминокислоты	Периоды опытов					
	первая серия			вторая серия		
	1 контроль	2 ацетат	3 пропионат	1 контроль	2 казеин	3 казеин+ пропионат
Таурин	0,757	0,883*	0,857	1,043	1,010	1,026
Асп. к-та	1,915	1,352*	1,355*	1,289	1,228	1,516
Треонин	0,945	1,059	1,153*	0,869	0,900	1,198*
Серин	0,639	0,601	0,849*	0,530	0,598	0,728*

Продолжение таблицы 2						
Глут. к-та	2,111	1,272*	1,644	1,179	1,270	1,537*
Глутамин	0,426	0,319*	0,335	0,673	0,603	0,361*
Глицин	1,842	2,080	2,726*	1,973	2,053	2,308*
Аланин	1,108	1,085	1,587*	1,109	1,212	1,387*
Валин	1,942	2,274	2,333	1,944	2,343*	2,286
Цистин	0,194	0,198	0,189	0,205	0,221	0,170
Метионин	0,210	0,248	0,244	0,284	0,300	0,297
Изолейцин	1,490	1,499	1,123	1,639	1,563	2,073*
Лейцин	0,970	1,271*	1,055	1,251	1,705	2,072*
Тирозин	0,639	0,706	0,703	0,670	0,831	1,007
Фенилаланин	0,405	0,940*	0,538	0,665	0,556	0,793*
Орнитин	0,693	0,559*	0,647	0,745	0,708	0,682
Лизин	0,861	1,015	1,102*	1,135	1,290	1,224
1-метил-гистидин	0,409	0,582	0,647*	0,536	0,759	0,742
Гистидин	0,737	0,922*	0,884	0,782	1,031*	1,006
Аргинин	0,793	0,879	1,002*	0,962	0,864	0,816*
СУММА	19,085	19,744	20,973	19,383	21,045	23,229

Примечание. * – здесь и в других таблицах достоверно при $P < 0,05$

Известно, что использование свободных аминокислот молочной железой зависит как от концентрации их в притекающей крови, так и скорости кровотока через эту железу. Интенсивность поглощения свободных аминокислот молочной железой вычисляли как процент артерио-венозной разности по каждой аминокислоте от концентрации ее в артериальной крови (табл. 4). Поглощение свободных аминокислот в единицу времени с учетом скорости кровотока вычисляли по формулам, приведенным в работе Linzell (1974).

Таблица 3. А-В разность свободных аминокислот (мг%) по молочной железе коров

Аминокислоты	Периоды опытов					
	первая серия			вторая серия		
	1 кон- троль	2 ацетат	3 пропионат	1 контроль	2 казеин	3 казеин+ пропионат
Таурин	0,041	0,023	0,069*	0,028	0,082*	0,080*
Асп. к-та	0,180	0,080*	0,132	0,117	0,108	0,158
Треонин	0,103	0,192	0,220*	0,142	0,163	0,220*
Серин	0,087	0,137	0,182*	0,132	0,157	0,162
Глут. к-та	0,412	0,434	0,453	0,373	0,356	0,403
Глутамин	0,380	0,230*	0,163	0,157	0,103*	0,129
Глицин	0,123	0,151	0,188*	0,156	0,182	0,155
Аланин	0,047	0,106*	0,160*	0,127	0,115	0,141

Продолжение таблицы 3

Цитрулин	0,052	0,083	0,071	0,085	0,088	0,032
Валин	0,275	0,232	0,492*	0,209	0,320*	0,310*
Цистин	0,032	0,025	0,094	0,012	0,033	0,034
Метионин	0,079	0,107	0,115	0,084	0,107	0,126
Изолейцин	0,188	0,210	0,304*	0,223	0,373	0,438*
Лейцин	0,262	0,361	0,456*	0,345	0,482	0,607*
Тирозин	0,237	0,204	0,164*	0,181	0,211	0,252
Фенилаланин	0,125	0,240*	0,147	0,206	0,165	0,214
Орнитин	0,104	0,133	0,170*	0,182	0,154	0,163
Лизин	0,219	0,332	0,382*	0,418	0,442	0,357
Гистидин	0,071	0,160*	0,154	0,142	0,116	0,191*
Аргинин	0,320	0,403	0,433*	0,331	0,283	0,334
СУММА	3,328	3,842	4,511	3,650	4,040	4,506

Таблица 4. Интенсивность поглощения свободных аминокислот молочной железой коров (%)

Амино- кислоты	Периоды опытов					
	первая серия			вторая серия		
	1 контроль	2 ацетат	3 пропионат	1 контроль	2 казеин	3 казеин+ пропионат
Таурин	5,28	2,26	8,16	1,91	7,92	7,79
Асп. к-та	3,39	5,92	9,74*	8,53	8,14	10,55
Треонин	11,64	17,94	19,08*	16,57	18,88	18,36
Серин	12,52	21,63	22,37*	24,90	25,08	21,98
Глут. к-та	19,90	33,80	27,37	32,23	27,55	26,02
Глутамин	89,2	75,20	47,76	23,32	16,58*	36,01
Глицин	6,51	7,21	6,97	7,60	8,76	6,50*
Аланин	4,24	10,13	10,08	10,82	9,90	10,09
Валин	13,90	10,13	21,00*	10,80	13,66	13,99
Цистин	15,46	12,62	47,61*	5,85	13,57	17,64*
Метионин	37,62	44,35	47,13	28,16	36,66	42,42*
Изолейцин	12,75	14,00	26,71*	13,42	24,95	20,74
Лейцин	27,01	30,68	42,65	27,18	28,15	29,44
Тирозин	35,99	28,32	23,32*	26,86	26,47	25,82
Фенилаланин	29,62	25,53	27,88	30,07	28,77	27,74
Орнитин	15,00	23,79	26,27	25,50	21,18	24,92
Лизин	25,55	32,51	34,48	37,00	34,10	28,59*
Гистидин	9,49	17,35*	14,70	17,90	10,67	18,88
Аргинин	40,48	45,50	42,91	34,30	32,41	40,44

Сопоставление количества поглощенных молочной железой аминокислот с фактическим выходом их в составе молока (обеспеченность синтеза белка аминокислотами) показало, что большинство незаменимых

аминокислот потреблялось в количествах, достаточных для синтеза белков, выделяемых с молоком, а поглощение ряда заменимых аминокислот (аспартат, серин, глутамат, аланин) происходило в меньшем объеме, чем их выделялось с молоком (табл.5). Известно, что эти аминокислоты могут синтезироваться в клетках молочной железы из глюкозы и низкомолекулярных жирных кислот, а также незаменимых аминокислот, потребляемых молочной железой в избытке. Особенно высокие показатели поглощения характерны для аргинина (свыше 200% от его выделения в составе белков молока), который используется в синтезе других аминокислот, в частности пролина, входящего в заметных количествах (около 10%) в состав белков молока (табл.5).

При инфузии ацетата или пропионата возрастала обеспеченность синтеза молочных белков всеми незаменимыми аминокислотами (табл.5), а также серином и аланином. Вместе с тем, относительно снижалось поглощение аспартата, тирозина и в меньшей степени глутамата.

В отдельные периоды опыта обеспеченность синтеза молочного белка рядом незаменимых аминокислот была значительно ниже 100%, вероятно по той причине, что часть белков молока и пептозных фракций поступали из плазмы крови.

Таблица 5. Обеспеченность синтеза молочного белка в молочной железе свободными аминокислотами крови, %

Аминокислоты	Периоды опытов					
	первая серия			вторая серия		
	1 контроль	2 ацетат	3 пропионат	1 контроль	2 казеин	3 казеин+ пропионат
Аспартат	67,2	27,7*	42,8	40,1	35,6	57,7
Треонин	62,2	99,6*	98,0*	79,4	91,6	120,0*
Серин	33,9	51,1	69,8*	54,6	60,6	65,3
Глутамат	55,6	52,8	51,7	49,1	44,2	51,1
Глицин	215,2	249,0	294,7	262,0	307,6	258,6
Аланин	39,8	86,4*	118,6*	99,4	97,0	114,0
Валин	118,6	94,4	186,7*	89,9	133,9*	135,4*
Цистин	87,0	67,1	225,0*	34,0	82,8*	83,9*
Метионин	75,1	103,5*	101,1	79,2	106,3	123,2*
Изолейцин	79,8	81,8	109,4*	90,3	156,2	174,3*
Лейцин	68,5	84,8	102,1*	86,8	119,6	153,8*
Тирозин	116,0	93,4	71,1	88,6	105,8	126,5
Фенилаланин	64,1	119,0*	69,6	104,3	81,8	113,4
Лизин	69,9	95,3	104,2*	129,6	132,6	106,7
Гистидин	67,5	143,2*	108,8	131,8	101,1	176,7
Аргинин	224,0	286,9	260,2	224,9	186,0	221,8

Повышение уровня незаменимых аминокислот, поглощаемых молочной железой коров во 2-й и 3-й периоды опыта, сочеталось с увеличением обеспеченности ими синтеза белков молока (табл. 5), что вероятно было сдерживающим фактором в контрольном периоде. Увеличение молочной продуктивности коров, в том числе суточного выделения белков в составе молока, при внутрирубцовой инфузии ацетата и пропионата, было вызвано сберегающим эффектом ЛЖК на аминокислоты, в том числе незаменимые, которые в 1 периоде использовались в энергетических целях через реакции глюконеогенеза. Это подтверждается снижением уровня мочевины в крови коров на 23,8% в период инфузии ацетата и на 20,3% после введения пропионата по сравнению с контрольным периодом, а также уменьшением выделения азота с мочой (табл.6). По данным Курилова (1987), Медведева (1999), при инфузии пропионата в печени лактирующих коров свыше 30% его может превращаться в глюкозу. Повышение ее уровня в крови в наших опытах также возможно объяснить превращением пропионата в глюкозу. В свою очередь пропионат и глюкоза могли повысить уровень инсулина в крови, что способствовало увеличению концентрации белка в молоке коров и его продукции.

Таблица 6. Содержание мочевины и глюкозы в артериальной крови и выделение азота с мочой у коров

Показатели	Периоды опытов					
	первая серия			вторая серия		
	1 контроль	2 ацетат	3 пропионат	1 контроль	2 казеин	3 казеин+ пропионат
Мочевина, мг%	23,75	18,10*	18,93	22,40	24,20	19,30
Глюкоза, мг%	44,6	40,1	50,2*	44,6	52,2*	51,1*
Азот мочи, г/сут	83,7	44,5*	39,8*	83,7	88,8	89,5

Увеличение жирности молока и суточной продукции жира у коров под влиянием инфузии в рубец ацетата было вполне предсказуемым, т.к. ацетат является одним из основных предшественников для синтеза коротко - и среднецепочечных жирных кислот в молочной железе коров.

Повышение образования жира в молочной железе коров при введении в рубец пропионата подтвердить имеющимися литературными данными пока не представляется возможным, т.к. пропионату не приписывается большого значения в процессе липогенеза (Пиатковский и др., 1987; Cant et al., 1993), но подтверждено его влияние при жиरोобразовании (жироотложении) в тканях. Возможно особенности рациона и

сложившиеся соотношения образовавшихся субстратов для метаболизма, а также физиологическое состояние животных (начало лактации) наложили свой отпечаток на пути воздействия пропионата в этих условиях.

Во второй серии (группе) опытов на фоне контрольного рациона был создан повышенный уровень поступления аминокислот из пищеварительного тракта за счет инфузии в кишечник коров казеината натрия в количестве 250 г, или около 180 г белка, что составляло около 10% от сырого протеина рациона. При этом молочная продуктивность коров не изменилась, отмечено лишь некоторое увеличение выделения общего белка с молоком (+2,4%). Можно предположить, что был создан излишне высокий фон аминокислот в организме коров, что подтверждается увеличением уровня свободных аминокислот в артериальной крови на 10,4% (табл.2). Эти изменения обусловлены в основном незаменимыми аминокислотами, кроме изолейцина, фенилаланина и аргинина, концентрация которых в крови несколько снизилась. При этом увеличение показателя артерио-венозной разности и степени поглощения (извлечения) в молочной железе заметным было лишь для таких аминокислот, как валин, изолейцин и лейцин, а по некоторым аминокислотам эти показатели даже снизились (фенилаланин, гистидин, аргинин) (табл.3). Возросла обеспеченность белкового синтеза в молочной железе большинством незаменимых аминокислот, кроме фенилаланина, гистидина и аргинина, поглощение которых по отношению к количеству синтезированного белка молока снизилось, хотя и оставалось на высоком уровне - более 100% (табл.5).

Увеличение фонда аминокислот в крови в данном периоде опыта привело к окислению их в тканях подопытных животных, что подтверждают данные по увеличению концентрации мочевины в крови коров в среднем на 7,8% и выделения азота с мочой на 6,1% по сравнению с контрольным периодом (табл.6).

Дополнительное введение в рубец раствора пропионата как источника энергии на фоне основного рациона и внутрикишечной инфузии казеина не изменило уровень молочной продуктивности коров, в том числе выделение белка с молоком, но заметно увеличило жирность молока и суточную продукцию молочного жира. Прямого воздействия пропионата на образование молочного жира не установлено, поэтому объяснить указанный факт очень сложно. Несмотря на существенное снижение концентрации мочевины в крови коров после добавления пропионата (-20%), выделение азота с мочой оставалось на прежнем уровне, т.е. использование аминокислот на синтез белка в организме не улучшилось, несмотря на дополнительное обеспечение животных энергией за счет пропионата.

Наблюдаемые изменения показателей продуктивности и азотистого обмена у коров в первой и второй сериях опытов были различными. Возможно, это связано не только с более ощутимым и, по-видимому, излишним количеством введенных в кишечник аминокислот, но и с изменением физиологического состояния животных и фазы лактации. Однозначно показано, что хотя пропионат и слабо поглощается молочной железой, и не является непосредственным источником энергии для синтеза компонентов молока или их предшественников, однако он эффективно используется в тканях, высвобождая глюкозу. Кроме того, он является ее источником в реакциях глюконеогенеза, протекающих в основном в печени.

Заключение

Результаты опыта свидетельствуют, что внутрирубцовая инфузия ацетата или пропионата, как источников энергии и предшественников компонентов молока, в количестве 5% от обменной энергии рациона, увеличивает продукцию молочного жира и белка за счет повышения энергообеспечения синтетических процессов в молочной железе и тканях организма и эффективного использования аминокислот и жирных кислот.

При повышенном поступлении аминокислот из кишечника за счет инфузии казеина, дополнительное введение пропионата увеличивало выделение молочного жира и отложение белка и жира в теле коров.

Нагрузка ацетатом и пропионатом методом инфузии в рубец может рассматриваться как тест для оценки обеспеченности организма коров аминокислотами.

Материалы исследований предполагается использовать при совершенствовании нормативов аминокислотного питания лактирующих коров и при уточнении механизмов, регулирующих образование компонентов молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М., 1965.
2. Курилов Н.В. Современный подход к нормированию протеинового питания жвачных животных. Вестник сельск. науки, 1987, 11: 124-132.
3. Медведев И. К. Материалы коорд. совещ.: Проблемы и перспективы развития теории питания жвачных животных на основе субстратной обеспеченности метаболизма. Боровск, 1999: 41-49.
4. Справочное пособие: Методы биохимического анализа. Боровск, ВНИИФБиП, 1997.

5. Новая система оценки и нормирования протеинового питания коров. Боровск, ВНИИФБиП, 1989, 105 с.
6. Пиатковский Б. и др. Использование питательных веществ жвачными животными (пер. о нем.) М., 1987.
7. Mepham T.B. (Ed.). Biochemistry of lactation. Amsterdam – New York. 1983, 500 p.
8. Cant J.P. et al. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to protein depression. Dairy Sci., 1993, 76: 762-774.
9. Linzell J.L. Mammary blood flow and methods of identifying and measuring precursor of milk. In: Lactation. A comprehensive treatise. N.Y.-L., 1974, 1: 143-1225.

ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ОРГАНИЗМА КОРОВ АМИНОКИСЛОТАМИ ПРИ НАГРУЗКАХ СУБСТРАТАМИ

Д.В. Карпов

Лаборатория белково-аминокислотного питания

В статье приведены результаты экспериментальной проверки метода нагрузок субстратами, путем инфузии их в пищеварительный канал, в качестве теста, отражающего обеспеченность лактирующих коров белком и аминокислотами.

Введение

В разрабатываемой в институте системе нормированного питания основное внимание уделяется оптимизации поступления субстратов, лимитирующих процессы синтеза компонентов продукции (Кальницкий, Харитонов, 2001; Новая система..., 1989). К настоящему времени разработаны методические подходы, основанные на факториальном методе расчета потребности, с учетом физиологического состояния животных и их продуктивности. Для определения адекватности установленной потребности в основных субстратах для физиологических функций организма коров найдены критерии, позволяющие оценить обеспеченность отдельными питательными веществами организма коров (Справочное руководство..., 2001; Черепанов, 1997). Эффективное использование отдельных аминокислот организмом коров зависит не только от их количества или соотношения в кормах и во всасываемой из кишечника смеси, но и от наличия других метаболитов, в первую очередь энергетических, обеспечивающих биосинтез белка, а также сокращающих расход аминокислот на эти цели через глюконеогенез. В связи с этим обеспеченность организма коров аминокисло-

тами мы определяли путем инфузии растворов отдельных метаболитов или их сочетания в пищеварительный канал.

Материал и методы

Экспериментальная проработка поставленной задачи осуществлялась в комплексном опыте методом периодов в 5 сериях эксперимента, по два опыта в каждой, на 6 лактирующих коровах-первотелках, разделенных на две группы по молочной продуктивности и живой массе. Подопытные животные были хирургически подготовлены к опытам путем установки «лодочки» на сонную артерию и канюли на рубец и двенадцатиперстную кишку. Исследования проведены на 60-90 дни после отела коров. Во все периоды эксперимента коровы получали рацион с содержанием концентрированных кормов на уровне 50-60%. Кормление коров трехразовое. Базовый рацион подопытных животных включал сено – 20-25%, силос – 20-25% и концентраты – 50% (табл. 1). Комбикорм для коров состоял из пшеницы, ячменя, кукурузы, подсолнечникового жмыха и минеральных добавок.

Таблица 1. Рационы кормления коров

Корма	1 группа	2 группа
Сено, кг	6	6
Силос разнотравный, кг	18	21
Комбикорм, кг	6	7
В рационе содержалось, г		
Сухое вещество	14879	16589
Сырой протеин	1926	2179
Распадаемый протеин	1251	1525
Сырая клетчатка	2883	3157
Сырая зола	967	1092
Липиды	536,6	605,8
НДК	5838	6396
КДК	2912	3088
Лигнин	594,8	654,7
Целлюлоза	2217	2433
Гемицеллюлоза	3060	3347
Крахмал	2624	3037
Сахар	492	546

Серии опытов (периоды) заключались в пятидневных нагрузках отдельными субстратами через рубец и кишечник, дополнительно к основному рациону в дозе 8,5 МДж. На 5-й день у животных отбирали пробы

крови в 7, 11 и 16 часов после кормления из сонной артерии с целью изучения азотистых метаболитов крови. В конце каждого периода проводили 2-суточный сбор мочи. Во время основного (контрольного) периода провели балансовый опыт и суточный сбор химуса для расчета поступления аминокислот из пищеварительного тракта.

Провели 4 серии (периода) исследований с нагрузкой отдельными субстратами (высшие жирные кислоты, ацетат, глюкоза, аминокислоты, смесь аминокислот с глюкозой, ацетатом).

Схема эксперимента

№№ серии	Вид нагрузки	
	1 группа	2 группа
1	Контроль	Контроль
2	ВЖК – 220 г	Ацетат – 600 г
3	Контроль	Контроль
4	Казеин – 350 г	Глюкоза – 500 г
5	Казеин – 350 г + ацетат – 300 г	Казеин – 350 г + глюкоза – 250 г

Во все периоды опыта учитывали поедаемость отдельных кормов и молочную продуктивность коров. Пробы кормов, кишечного химуса и молока анализировали на содержание азота и общих аминокислот, в цельной крови определяли свободные аминокислоты. Кроме того, в крови анализировали мочевины и глюкозу (Справочное пособие..., 1977).

Результаты и обсуждение

Показатели изменения молочной продуктивности по периодам опыта представлены в таблице 2.

Таблица 2. Показатели молочной продуктивности

Периоды (серии) опыта	Группа коров	Удой, кг/сутки	Содержание жира, %	Содержание протеина, %	Выделено жира с молоком, г/сутки	Выделено протеина с молоком, г/сутки
1-й – предварительный период	1	15,57	3,61	2,57	568	400
	2	20,33	3,57	2,68	726	544
2-й – инфузия:						
ВЖК	1	15,71	3,68	2,52	579	396
Ацетат	2	20,39	3,88	2,64	790	537

Продолжение таблицы 2						
3-й балансовый опыт	1	16,17	3,55	2,56	574	414
	2	20,57	3,60	2,70	741	555
4-й – инфузия:						
Казеин	1	16,80	3,83	2,67	640	448
Глюкоза	2	20,70	3,87	2,79	800	577
5-й – инфузия:						
Казеин+ацетат	1	16,51	3,86	3,08	637	509
Казеин+глюкоза	2	20,47	3,93	3,08	804	631

В предварительный период различия между группами коров по удою составили 4,76 кг в сутки на голову, или 23,4%. После инфузии смеси ВЖК (1 гр.) через канюлю в кишечник или раствора ацетата в рубец (2 гр.) изменений в продуктивности коров обеих групп не отмечено (табл. 2). Видимо, это связано с периодом адаптации животных к процедуре инфузии растворов, что причиняло животным беспокойство и нарушало обычный стереотипный распорядок дня.

Тем не менее можно отметить определенные изменения в показателях крови у животных в период инфузии. Повысилось содержание свободных аминокислот в крови коров обеих групп, в основном за счет большинства незаменимых аминокислот, при снижении процента таурина, аспартата, глутамина, глицина, цитрулина и валина (табл. 3).

Таблица 3. Уровень свободных аминокислот в артериальной крови коров, % от суммы

Аминокислоты	1 группа		2 группа	
	Предварительный период	2-й период ВЖК	Предварительный период	2-й период ацетат
Таурин	4,38	3,93	5,76	4,36
Аспарагиновая кислота	6,62	6,31	8,61	7,22
Треонин	2,54	2,94	2,55	3,48
Серин	1,63	2,39	1,68	2,05
Глутаминовая кислота	5,25	6,58	5,80	8,33*
Глутамин	11,13	6,59	11,46	8,69
Глицин	16,23	11,32	13,89	10,22
Аланин	5,16	5,45	6,40	4,98
Цитрулин	5,37	4,06*	6,25	3,80*
α -аминомасляная к-та	0,85	0,73	0,99	0,71
Валин	10,35	9,18	9,26	8,89
Цистин	0,41	0,39	0,49	0,31
Метионин	0,99	1,30	0,87	1,28
Изолейцин	2,59	8,51*	2,43	6,88*
Лейцин	5,04	5,35	4,29	4,96

Продолжение таблицы 3				
Тирозин	3,28	4,01	3,52	3,74
Фенилаланин	1,84	4,76*	1,70	2,34
Орнитин	1,43	1,12	1,25	2,28
Лизин	3,59	4,46	2,65	4,59*
1-метилгистидин	3,89	3,38	3,88	4,64
Гистидин	3,08	4,49	2,97	3,82
Аргинин	2,25	3,14	3,30	2,43
Сумма, мг%	19,98	22,83	22,45	20,90

Примечание: * - здесь и далее в таблицах достоверно, $P < 0,05$

Это связано, вероятно, со снижением интенсивности использования незаменимых аминокислот в глюконеогенезе, подтверждением чему служит уменьшение уровня мочевины и повышение отложения азота в теле (табл. 4).

В период проведения основного балансового опыта продуктивность коров обеих групп оставалась примерно на прежнем уровне и различалась на 4,4 кг на голову в сутки, или на 21,3% при разнице в потреблении сухого вещества рациона на 16% и сырого протеина на 19. Введение 350 г казеина в кишечник животным 1 группы несколько повысило удои (на 3,9%), содержание жира и белка в молоке, что в конечном итоге привело к увеличению выделения жира и белка с молоком за сутки соответственно на 11,5 и 8,2%(табл. 2).

Таблица 4. Содержание мочевины и глюкозы в крови и выделение азота с мочой коров, мг%

Периоды опытов	Группа коров	Показатели			
		мочевина, мг%	глюкоза, мг%	азот мочи, г/гол/сут	отложено азота в теле, г/гол/сут
1-й – предварительный (контроль)	1	23,82	38,80	–	–
	2	22,57	40,44	–	–
2-й – инфузия ВЖК	1	21,15	39,53	74,63	32,65
	2	18,01*	41,51	69,56	30,04
3-й – балансовый опыт (контроль)	1	23,4	45,8	92,78	5,82
	2	23,1	42,4	91,70	20,48
4-й – инфузия: казеин	1	26,9*	48,2	122,93*	31,33
	2	21,0	51,3*	97,23	10,48
5-й – инфузия: казеин+ацетат	1	23,7	44,3	–	–
	2	24,6	46,4	–	–

Несмотря на дополнительное поступление аминокислот из кишечника после переваривания казеина, в крови не отмечено существенного повышения содержания свободных аминокислот во все часы взятия проб, хотя относительное содержание большинства незаменимых аминокислот несколько увеличилось (табл. 5). Снижение уровня глюкогенных аминокислот явилось, вероятно, результатом усиления глюконеогенеза, что сопровождалось одновременным повышением в крови концентрации мочевины и глюкозы, увеличенным выделением азота с мочой. Подобные изменения отмечены ранее другими исследователями (Wolf, Bergman, 1972) при дополнительном вливании в сычуг смеси аминокислот накормленным животным. По-видимому, из-за относительно короткого периода инфузии казеина (10 часов) аминокислоты не могли эффективно быть использованы для синтеза белков в органах и тканях животного, в том числе в молочной железе.

В определенной мере эти предположения подтверждает следующий период опыта, когда коровам 1-й группы наряду с инфузией казеина в кишечник, в том же количестве дополнительно в рубец вводили раствор ацетата как источник энергии. При этом к концу периода молочная продуктивность коров возросла лишь по сравнению с контрольным периодом (на 2,1%), однако количество белка в суточном удое увеличилось на 22,9% против контрольного периода и на 13,6% по сравнению с периодом введения казеина (II контроль).

При этом содержание жира и валовое выделение его с молоком у коров увеличилось по сравнению с контрольным периодом на 0,21 абсолютных процента. Не наблюдалось различий по этим показателям с предшествующим периодом (4-й). Произошло некоторое снижение уровня свободных аминокислот крови у коров по сравнению с предшествующим периодом опыта, в том числе ряда незаменимых (метионин, изолейцин, лейцин и др.), которые могли использоваться на синтез белков молока.

Коровам 2-й группы, как отмечено в методике, после проведения балансового опыта (3-й контрольный период) на фоне основного рациона в кишечник инфузировали раствор глюкозы со скоростью 41,6 г вещества в час. У двух из трех животных наблюдалось небольшое снижение потребления сухого вещества рациона в основном за счет грубых кормов. Увеличилась продукция молочного жира на 8% и белка на 4% за счет повышения содержания этих компонентов в молоке и в меньшей степени оно зависело от величины удоя (+0,6%).

Общее содержание свободных аминокислот в артериальной крови не претерпело существенных изменений по сравнению с контрольным периодом, но повысилось относительное содержание главных глюкогенных

аминокислот (аспартат, глутамат, аланин), а также глицина и серина, что отражает снижение их использования в энергетических целях (табл.5).

Таблица 5. Содержание свободных аминокислот в артериальной крови коров, % от суммы

Аминокислоты	1 группа			2 группа		
	Периоды опыта					
	Баланс (контроль)	Казеин	Казеин +ацетат	Баланс (кон- троль)	Глюкоза	Глюкоза +казеин
Таурин	5,20	5,46	4,98	5,38	6,56	6,78
Аспарагиновая кислота	6,82	6,21	5,90	6,15	8,28	6,82
Треонин	3,43	3,26	3,08	3,40	3,48	3,29
Серин	2,58	2,57	2,35	2,93	3,64	3,12
Глутаминовая кислота	5,97	5,44	6,03	5,56	6,35	5,88
Глутамин	5,44	7,92	6,46	6,27	7,45	7,67
Глицин	17,70	12,87*	14,07	15,62	18,11	11,02*
Аланин	5,77	5,78	5,08	5,37	4,92	4,23
Цитрулин	4,17	4,05	3,38	3,48	3,34	3,05
α -аминомасля- ная к-та	0,72	0,63	0,92	0,77	0,57	0,78
Валин	9,30	6,81*	9,21	7,51	4,50*	9,04*
Цистин	0,49	0,44	0,39	0,29	0,33	0,36
Метионин	0,80	1,39	0,98	1,20	1,65	0,84
Изолейцин	5,76	6,93	5,25	6,98	5,61	6,09
Лейцин	4,44	7,56*	6,38	6,45	4,62	6,23
Тирозин	3,25	4,29	4,03	4,13	4,38	3,98
Фенилаланин	2,38	2,17	2,45	2,64	2,58	2,95
Орнитин	1,96	2,12	2,41	1,94	1,74	2,43
Лизин	4,38	4,98	6,32*	4,01	3,56	4,90
1-метилгисти- дин	3,22	2,48	2,55	3,37	3,22	3,08
Гистидин	3,29	3,82	5,26	3,77	2,66	4,47
Аргинин	2,93	2,88	2,52	2,83	2,42	2,99
Сумма, мг%	22,10	20,90	18,70	20,58	17,83	22,34

Известно, что жвачные удовлетворяют большую часть потребности в глюкозе за счет глюконеогенеза, в котором на долю аминокислот приходится до 25% (Курилов, 1987). Внутривенное введение глюкозы жвачным вызывает резкое торможение глюконеогенеза (Hutton, Annison, 1972). Вероятно действие глюкозы осуществляется через усиление секреции инсулина, который подавляет синтез глюкозы в особенности из аминокислот (предположительно путем ингибирования пируваткарбоксилазы) (Медведев, 1997). При вливании глюкозы нами отмечено снижение уровня моче-

вины в крови, что указывает на снижение процессов распада аминокислот, связанных с глюконеогенезом.

До 65% глюкозы, введенной в двенадцатиперстную кишку, подвергается окислению. Вместе с тем, значительная часть глюкозы крови (свыше 70%) в молочной железе используется на синтез лактозы и частично на образование глицерина (Медведев, 1997; Merham, 1983). Отмеченное нами снижение в крови процента свободных незаменимых аминокислот (треонин, валин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, гистидин, аргинин) связано вероятнее всего с использованием их в синтезе белков молока, включающих эти аминокислоты в большей пропорции, чем во фракции свободных аминокислот в крови, потенциально лимитирующих молочную продуктивность. Вместе с тем, в проведенном опыте дополнительное введение глюкозы в большей мере способствовало продукции молочного жира, чем белка. При этом почти в 2 раза сократилось отложение в организме азотистых веществ и усилилось их выделение с мочой. Вероятно, это было вызвано временной гипер-гликемической реакцией.

Снижение количества вводимой в кишечник глюкозы в 2 раза и добавление 360 г казеината натрия в 5-м периоде опыта привело к существенному увеличению выделения молочного белка, как в сравнении с контрольным (3-м) периодом (+13,7%), так и с предшествующим (глюкоза) (+9,7%), в то время как продукция молочного жира осталась на уровне периода с введением одной глюкозы. В крови коров был более высокий в сравнении с предшествующим периодом уровень мочевины и свободных аминокислот, в большей мере за счет валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, лизина, гистидина и аргинина (незаменимые аминокислоты) при снижении доли главных глюкогенных заменимых аминокислот, что в основных чертах напоминает картину при введении одного казеина животным 1-й группы (4-й период). Возросло потребление сухого вещества рациона и отложение азота в теле животных.

Определение количества аминокислот, поступающих в тонкий кишечник из желудка, с помощью инертных индикаторов (Харитонов, 1999) в период проведения балансового опыта выявило, что у коров 2-й группы этот показатель на 23% превышал величину у животных 1-й, менее продуктивной группы животных (табл. 6).

Выделение аминокислот в составе белков молока составило 23,6 и 25,9 % от поступивших из желудка в кишечник соответственно у коров I и II групп, т.е. у животных с более высокой продуктивностью эффективность использования аминокислот кишечного химуса была выше на 9,7% относительных процента.

Таблица 6. Показатели химуса 12-перстной кишки и молока коров

Показатели	Группа коров		+ II гр. к I, %
	I	II	
Потреблено протеина, г/сут	1690±30	2055±24	+21,6
Поступило протеина в кишечник, г/сут	1942±160	2400±143	+23,6
% от потребленного	114,9	116,6	+1,9
Поступило аминокислот в кишечник, г/сут	1609±73	1989±68	+23,6
Выделено белка с молоком, г/сут	414,3±6,0	555,3±4,5	+34,0
% от потребленного протеина	24,5	27,0	+10,2 от-нос. %
Выделено аминокислот с молоком, г/сут	381,1±4,9	515,4±8,0	+35,2
% от поступивших с химусом	23,6	25,9	+9,7 от-нос. %

Аминокислотный состав химуса не имел существенных различий у коров обеих групп (табл. 7) и, по-видимому, не может служить критери-

Таблица 7. Аминокислотный состав химуса 12-перстной кишки и молока коров (% от суммы)

Аминокислоты	Химус 12-перстной кишки		Молоко (в среднем)
	1 группа	2 группа	
Аспарагиновая кислота	11,12	10,21	6,80
Треонин	5,13	4,98	4,49
Серин	5,58	5,31	6,01
Глутаминовая кислота	16,05	15,36	19,44
Пролин	—	—	9,29
Глицин	14,44	13,24	1,41
Аланин	5,82	6,10	3,10
Валин	4,01	4,12	5,81
Цистин	1,22	1,42	0,91
Метионин	4,59	5,18	2,51
Изолейцин	3,78	3,88	5,96
Лейцин	7,71	7,46	9,82
Тирозин	4,85	5,44	5,99
Фенилаланин	3,38	3,33	4,78
Лизин	5,75	5,98	8,16
Гистидин	1,72	1,71	2,68
Аргинин	4,76	4,98	3,67

ем обеспеченности животных аминокислотами в данных условиях кормления. В поддержании относительного постоянства состава кишечного химуса, как известно (Курилов, 1987), большую роль играет эндогенное поступление азотистых и других веществ.

Заключение

Метод функциональных нагрузок путем инфузии ацетата, глюкозы и других субстратов в пищеварительный канал с учетом при этом потребления корма, баланса азота, уровня мочевины, свободных аминокислот и их соотношения в крови, изменения молочной продуктивности и качества молока позволяет оценить степень обеспеченности лактирующих коров белком и аминокислотами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кальницкий Б.Д., Харитонов Е.Л. Новые разработки по совершенствованию питания молочного скота. Зоотехния, 2001, 11: 20-26.
2. Курилов Н.В. Метаболизм азота в пищеварительном тракте коров в зависимости от качества протеина корма. Сб. докладов IV Межд. симпозиума. Чехословакия, Кошице, 1987: 145-156.
3. Медведев И.К. Физиологические аспекты продуктивной эффективности молочного скота. В сб.: Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Боровск, 1997: 161-177.
4. Справочное пособие: Методы биохимического анализа. Боровск, ВНИИФБиП, 1997.
5. Новая система оценки и нормирования протеинового питания коров. Боровск, ВНИИФБиП, 1989, 105 с.
6. Справочное руководство: Физиологические потребности в питательных веществах и нормирования питания молочных коров. Боровск, ВНИИФБиП, 2001, 126 с.
7. Харитонов Е.Л. Эвакуаторная функция пищеварительного тракта жвачных животных в связи с факторами кормления. С.-х. биология, 1999, 4: 57-63.
8. Черепанов Г.Г. Современные подходы к проблеме прогнозирования продуктивности и адаптивно-метаболическая концепция нормированного питания животных. В сб.: Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Боровск, 1997: 18-29.
9. Mepham T.B. (Ed.) Biochemistry of lactation. Amsterdam – New York. 1983: 500 p.
10. Hutton K., Annison E.F. Control of nitrogen metabolism in the ruminantes. Proc. Nutr. Soc., 1972, 31: 151-158.
11. Wolf I.E., Bergman E.N. Gluconeogenesis from plasma amino acids in fed sheep. Am. J. Physiol., 1972, 223: 55-60.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ АМИНОКИСЛОТ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОРГАНИЗМА ТЕЛЯТ

Л.В. Харитонов¹, И.Л. Кузнецов², Е.Д. Пронькина², В.И. Великанов²
Лаборатория белково-аминокислотного питания¹
Нижегородская сельхозакадемия²

В статье рассматривается возможность использования препаратов аминокислот для регуляции неспецифической резистентности организма телят и в качестве средств метаболической фармакопрофилактики.

Введение

Одним из резервов увеличения продуктивности сельскохозяйственных животных является повышение их резистентности, особенно в условиях несбалансированного кормления и нарушений технологии содержания. Несмотря на множество предложенных для этих целей препаратов, преимущество имеют вещества природного происхождения, которые участвуют в процессах жизнедеятельности: витамины, коферменты, макро- и микроэлементы, пептиды и многие другие вещества. Сюда же относятся и аминокислоты, которые играют в организме не только пластическую и энергетическую роль, но и выполняют регуляторную функцию. Аминокислоты, их соли, смеси и производные, как препараты метаболической фармакотерапии, характеризуются безвредностью, малой выраженностью побочных эффектов и отсутствием аллергизирующего влияния. Во многих случаях они являются средствами патогенетической профилактики и терапии (Западнюк и др., 1982).

Важное значение аминокислоты имеют в питании и жизнеобеспечении новорожденных телят, составляя более 2/3 всех питательных веществ молозива и покрывая более половины энергетических затрат организма. Через молозиво осуществляется передача пассивного (колострального) иммунитета от матери к новорожденному теленку, что играет основную роль в его выживании. В раннем постнатальном онтогенезе, когда роль пассивного иммунитета уже снижается, а формирование собственного активного находится в начальной стадии, организм животного остается практически незащищенным (так называемая «иммунная брешь»). Именно в этот период наблюдаются вспышки заболеваний различной этиологии и

считается целесообразным применение различных способов стимуляции иммуногенеза.

Пока в ветеринарной практике в качестве лекарственных препаратов испытано небольшое количество аминокислот, в связи с недостаточной изученностью их фармакодинамики и терапевтической эффективности. Этому должно предшествовать изучение влияния препаратов аминокислот на различные функции организма в нормальных физиологических условиях, что и явилось предметом наших исследований, основной целью которых и было изучение влияния препаратов ряда аминокислот, отнесённых к группе медиаторных, на физиологическое состояние и резистентность организма телят молочного периода выращивания.

Материалы и методы

Научно-производственные опыты проводили в СПК «Нижегородец» Нижегородской области в 1999-2001 гг. Для опыта было отобрано 110 телят, сформированных по методу парных аналогов. Всего проведено четыре опыта. В первом опыте изучали действие смеси аминокислот на основе глутамата (+аспартат + глицин). Во втором опыте использовалась смесь аминокислот на основе таурина (+аспартат+глицин+глутамат), которые задавали новорожденным телятам в течение 5-7 дней с целью стимуляции процессов пищеварения, всасывания и повышения резистентности.

В других двух опытах использовались целлюлозные микросферы глицина и аланина, изготовленные в лаборатории иммунобиотехнологии ВНИИФБиП, которые в форме масляной взвеси вводили подкожно (Колоскова, Галочкин, 2000). В I и II опытах смеси аминокислот задавали через 10 минут после выпаивания молозива три раза в день. Были созданы по две группы телят, опытная и контрольная соответственно. В III опыте изучена эффективность целлюлозных микросфер глицина при введении его телятам 20-40- дневного возраста, а в IV опыте с этой же целью использовали целлюлозные микросферы аланина. В этих опытах было создано по три группы телят. Препарат глицина и аланина вводили двум группам телят подкожно, однократно в дозе 40 мг и 200 мг на животное во 2-ой и 3-ей группах соответственно. Телята 1-й группы были контрольными. Подопытные животные подвергались общеклиническому осмотру с проведением морфобиохимического и иммунологического анализа проб венозной крови.

В крови определяли количество форменных элементов, выводили лейкоцитарную формулу.

Состояние естественной резистентности у животных оценивали, анализируя лизоцимную и бактерицидную активность сыворотки крови, фагоцитарную активность нейтрофилов, с выведением фагоцитарного индекса (Кондрахин и др., 1985).

Экспериментальный материал обработан методом вариационной статистики по Плохинскому (1970).

Результаты и обсуждение

С контролем сравнивали две смеси аминокислот: на основе глутамата (+аспартат+глицин) и на основе таурина (+глутамат+аспартат+глицин). Первая смесь по соотношению аминокислот была близкой к составу свободных аминокислот молока, а вторая – к этой фракции молозива (табл.1).

Таблица 1. Свободные аминокислоты молозива (первого дня) и молока коровы

Аминокислоты	<i>Молозиво</i>		Молоко	
	мг%	% от суммы	мг%	% от суммы
Таурин	3,651	31,17	0,544	6,17
Аспарагиновая кислота	0,094	0,80	0,507	5,75
Глутаминовая кислота	3,027	25,80	3,015	34,21
Глицин	2,742	23,41	0,620	7,03
Другие аминокислоты	2,536	18,82	2,752	46,84

После трехкратного выпаивания смесей новорожденным телятам отмечено сходное изменение интенсивности всасывания иммуноглобулинов в течение первых суток после рождения: по сравнению с контрольными животными уровень иммуноглобулинов в крови телят «глутаматной» и «тауриновой» групп возрос соответственно на 25 и 23 % (табл.2).

Таблица 2. Концентрация иммуноглобулинов в крови телят

Группы телят	Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови, мг/мл	
	I опыт	
	Первая смесь аминокислот	
1. Контрольная		24,94±0,58
2. Опытная		31,30±0,93
	II опыт	
	Вторая смесь аминокислот	
3. Контрольная		25,65±0,71
4. Опытная		31,71±1,07

Вероятно свободные аминокислоты молозива, в период возможности всасывания иммуноглобулинов у новорожденных телят, играют при- сущие им физиологические функции и участвуют в биохимических пре- вращениях, характерных для других возрастных периодов животных: сти- мулируют всасывание глюкозы и ряда аминокислот, микро- и макроэле- ментов; влияют на моторику желудочно-кишечного тракта и эвакуацию; воздействуют на секреторную деятельность желудка, поджелудочной же- лезы и печени; стимулируют выделение кишечинальных гормонов и гор- монов «общего» действия и мн. др. При этом физиологический механизм действия использованных в опыте аминокислот сложен и многогранен. Все они относятся к группе медиаторных и воздействие может происхо- дить в том числе и через структуры центральной и вегетативной нервной системы.

При дальнейшем выпаивании растворов аминокислот у телят опытных групп по сравнению с контрольными были существенно выше показатели неспецифической резистентности в крови на 7-й день опыта (табл.3).

Предполагается, что увеличение лизоцимной активности сыворотки крови у телят «глутаматной» группы в 1,9 раза и «тауриновой» в 2,8 раза по сравнению с контролем связано, вероятнее всего, с активацией макро- фагов, так как лизоцим секретируется этими клетками, а также выделяется при дегрануляции полиморфноядерными нейтрофилами. Выраженное на- растание бактерицидной активности сыворотки крови после применения смесей аминокислот может быть объяснено активацией комплементар- ной системы крови, а также увеличением количества иммуноглобулинов.

Таблица 3. Показатели неспецифической резистентности телят на 7- й день исследования

Показатели	I опыт		II опыт	
	контрольная группа	опытная группа	контрольная группа	опытная группа
Бактерицидная активность, %	9,8±0,3	16,5±1,3*	10,1±0,6	18,2±1,2*
Лизоцимная активность, %	8,7±0,7	14,3±1,1*	6,5±0,7	15,8±0,8*
Фагоцитарная активность, %	43±2	58±2*	44±3	71±4*
Фагоцитарный индекс	1,10±0,07	1,90±0,10	1,15±0,04	1,96±0,04*

Примечание: * здесь и далее достоверно при $P<0,05$

Стимулирующий эффект «тауриновой» смеси на фагоцитарную активность нейтрофилов был выше контроля на 50 % и на 15 % превосходил «глутаматную» смесь. Увеличение этого показателя у животных опытных групп связано с активностью внутриклеточных систем фагоцитов и повышением опсонических свойств иммуноглобулинов.

Морфологические показатели крови в определенной мере подтверждают и согласуются с изменениями неспецифической резистентности (табл.4).

Отмечено увеличение уровня лейкоцитов у телят обеих опытных групп, причем в «тауриновой» группе это изменение носило достоверный характер (табл.4). У животных этой же группы наблюдали повышение процента палочкоядерных нейтрофилов и моноцитов, являющихся предшественниками более активно функционирующих клеток. Содержание моноцитов возросло также у телят «глутаматной» группы.

Таблица 4. Морфологические показатели крови телят на 7-й день исследования

<i>Показатели</i>	I опыт		II опыт	
	контрольная группа	опытная группа	контрольная группа	опытная группа
Эритроциты, млн/мкл	6,67±0,17	6,63±0,22	5,50±0,31	5,62±0,21
Лейкоциты, тыс/мкл	6,95±0,19	7,44±0,28	6,73±0,16	7,41±0,19*
Цветной показатель	0,92±0,03	0,92±0,03	0,98±0,07	1,02±0,03
Лейкоформула, % :				
базофилы	3	2	2	2
эозинофилы	2	4	2	1
палочкоядерные				
нейтрофилы	5	4	8	14
сегментоядерные				
нейтрофилы	24±3	21±2	21±2	20±1
лимфоциты	61±2	61±4	63±3	57±3
моноциты	5	8	4	6

Заболеваемость телят в «глутаматной» группе была ниже в 1,44, а в «тауриновой» в 1,32 раза, чем в контроле (табл.5). Сократилась на 2 дня длительность болезни и тяжесть течения (у телят сохранялся аппетит и не было выражено обезвоживание). Болезнь сопровождалась расстройством пищеварения. Острые инфекционные болезни в этот период были исключены ветеринарно-бактериологическими анализами и клиническими исследованиями. Заболевшим телятам опытных групп смесь аминокислот

задавали в тройной дозе, наряду с другими лечебными средствами, применяемыми в хозяйстве.

Таблица 5. Показатели заболеваемости новорожденных телят

Показатели	I опыт		II опыт	
	контрольная группа	опытная группа	контрольная группа	опытная группа
Количество телят, гол	12	12	12	12
Заболело новорожденных телят в первые 10 дней, гол	9	5	10	7
Заболеваемость, %	75	42	86	58
Длительность болезни, дни	4,0	2,0	4,5	2,5
Среднесуточный прирост живой массы за 1 месяц, г	365	429	345	422

В итоге прирост живой массы телят «глутаматной» группы за первый месяц выращивания был выше, чем в контроле на 17,5 %, а у животных «тауриновой» группы на 22,1 %, хотя при этом среднесуточный прирост не превышал 430 г/гол, то есть был ниже зоотехнической нормы для этого возрастного периода (табл.5).

Следует учесть, что заболеваемость телят даже в опытных группах превышала 40 %. За период болезни животные теряли живую массу из-за плохой переваримости корма и понижения аппетита, усиленного стгорания липидов и белков тела.

Полученные результаты по стимуляции резистентности телят с помощью смесей аминокислот заслуживают, на наш взгляд, внимания и дальнейшего изучения. Следует учесть, что использовалась лишь одна доза смесей аминокислот, вычисленная с учетом содержания свободных аминокислот в молозиве, потребляемом теленком за сутки.

Как профилактическое и лечебное средство при болезнях телят, сопровождающихся диарейным синдромом, аминокислоты могут оказывать разностороннее влияние на развитие патологического процесса, учитывая многообразие физиологических функций и биохимических свойств этих веществ. Помимо обнаруженной в опытах стимуляции неспецифической резистентности организма телят, аминокислоты могли оказать благоприятное воздействие благодаря детоксикации аммиака, фенолов и других конечных продуктов метаболизма, нейтрализации свободных радикалов и перекисей липидов и белков, обезвреживанию токсинов сальмонелл и кишечной палочки и многому другому. Детоксикация аммиака осуществляется в значительной мере за счет связывания его дикарбоновыми аминокислотами.

кислотами – глутаматом и аспаратом, с образованием соответствующих амидов – глутамина и аспарагина.

Известно, что болезни телят с диарейным синдромом сопровождаются явлениями аммонийного токсикоза и гипоксии в тканях (Захаренко и др., 1992), в профилактике и устранении которых глутамат и аспарат принимают активное участие (Маркова, Шабалов, 1993). Нейтрализация токсинов сальмонелл и кишечной палочки, которую по данным Западнюка и др. (1982) способны осуществлять глутаминовая и аспарагиновая кислоты, крайне важна при болезнях желудочно-кишечного тракта телят, поскольку в большинстве случаев заболевания протекают с участием представителей (штаммов) этой микрофлоры.

В обезвреживании бензойной кислоты участвует глицин путем образования гиппуровой кислоты, которая выводится из организма с мочой. Кроме того, по данным Белокрылова и сотр. (2000), глицин является одной из аминокислот, стимулирующих детоксикацию бензола и афлатоксина за счет лейкоцитов в организме.

При болезнях желудочно-кишечного тракта телят, как и при других патологиях, обычно возрастает образование свободных радикалов и перекисей липидов и белков, в нейтрализации которых может участвовать таурин как наиболее активный антиоксидант среди аминокислот (Маркова, Шабалов, 1993). Таурин обладает также целым рядом других свойств, проявление которых при состоянии пониженной реактивности и болезнях пищеварительного тракта может служить важным фактором в стимуляции резистентности и нормализации процессов пищеварения и межклеточного обмена. Сюда можно отнести способность таурина увеличивать освобождение эндотелиальными клетками простациклина, обладающего сосудорасширяющими и антиагрегационными-антиадгезивными свойствами. Обнаружено успокаивающее влияние таурина на животных как тормозного медиатора, что наряду с его антиоксидантными свойствами полезно при состоянии, характерном для развития болезней, сопровождающихся метаболическим стрессом (Маркова, Шабалов, 1993).

О стимулирующем влиянии изучаемых аминокислот, особенно таурина и глицина, на секрецию сычужных желез у телят, а также процессы всасывания питательных веществ в кишечнике нами уже сообщалось ранее (Харитонов и др., 2001).

Выявлены определенные различия в воздействии смесей аминокислот на процессы обмена веществ в организме телят и биохимические показатели крови, отражающие эти процессы. При этом наиболее четкие изменения произошли у телят, которым выпаивали смесь аминокислот на основе таурина. Можно отметить достоверное увеличение содержания белка,

общего глутатиона, липидов, показателя резервной щелочности и активности аланинаминотрансферазы (табл.6).

Все эти показатели взаимосвязаны между собой и отражают разнонаправленность воздействия аминокислот смеси.

Стимуляция всасывания продуктов расщепления составных частей молозива и их эффективное использование в организме на синтез белка, энергетические цели и факторы резистентности (защиты) способствовали увеличению в крови уровня белка, липидов, гемоглобина и глутатиона.

Таблица 6. Биохимические показатели крови телят на 7-й день исследования

Показатели	I опыт		II опыт	
	контрольная группа	опытная группа	контрольная группа	опытная группа
Общий белок, %	5,91±0,27	5,73±0,15	4,85±0,13	5,83±0,15*
Гемоглобин, %	11,3±0,38	10,95±0,72	9,5±1,2	10,7±0,7
Глутатион, мг%:				
- общий	39,6±1,6	34,1±2,7	32,3±2,6	46,2±1,2*
- восстановленный	33,8±0,5	28,0±1,6*	26,6±2,4	32,8±1,7
- окисленный	5,8±1,1	6,1±1,3	5,7±0,9	13,4±1,1*
Процент к общему:				
- восстановленный	85,4	82,1	82,4	71,0
- окисленный	14,6	17,9	17,6	29,0
Кальций, мг %	10,0	10,2	10,1	10,3
Фосфор неорган., мг %	4,03	4,12	2,85	3,29
Липиды, мг %	81,0	112,9	70,8	125,9
Резервн. щёлочн., мг %	334,6	372,3	238	269
АЛТ, ед/мл	0,24	0,26	0,21	0,29
АСТ, ед/мл	0,41	0,45	0,43	0,43

Физиологические функции 4-х изучаемых аминокислот часто совпадают или близки по своей направленности. Введение смеси этих аминокислот обусловило изменение биохимических и физиологических процессов в организме. Было отмечено повышение уровня свободных аминокислот в крови телят, причем в наибольшей степени тех, препарат которых вводился внутрь. При этом не установлено увеличения уровня мочевины в крови, что позволяет предположить более эффективное использование аминокислот на синтез белка, чем в энергетических целях, то есть не повысилась дезаминирование (окисление) аминокислот. Содержание глюкозы в крови телят опытных групп повысилось незначительно и обеспечивалось, вероятно, в основном за счет расщепления лактозы молозива.

Смесь аминокислот на основе таурина увеличила уровень глутатиона в крови телят. Известно, что этот трипептид включает в себя остатки глицина, глутамата и цистеина, последний из которых чаще всего лимитирует образование глутатиона. Вероятно таурин, как серосодержащая аминокислота, близкая в обмене с цистеином, способствовал образованию глутатиона. Смесь на основе глутамата, в которой отсутствовал таурин, не увеличивала синтез глутатиона. При этом уровень восстановленной формы глутатиона даже снизился по сравнению с контролем, что могло быть связано с повышением активности фермента глутатионпероксидазы, которая функционирует «в содружестве» с восстановленным глутатионом, окисляя последний.

Повышение уровня липидов в крови телят обеих опытных групп могло быть связано как с улучшением переваривания и всасывания липидов молозива, так и с меньшим их распадом для энергетических целей.

При дальнейших анализах крови подопытных животных различия основных биохимических показателей были менее выраженными, хотя и сохранились в своей основе. Иммунобиохимические показатели крови телят опытных групп на протяжении периода наблюдения превышали таковые у контрольных животных (табл. 7 и 8). Повышение неспецифической резистентности телят опытных групп привело к снижению заболеваемости новорожденных телят в первые 10 дней жизни.

Таблица 7. Динамика морфологических и иммунобиохимических показателей крови телят после выпаивания смесей аминокислот, I опыт

Показатели	Через 15 дней		Через 34 дня		Через 48 дней	
	контроль- ная группа	опытная группа	контроль- ная группа	опытная группа	контроль- ная группа	опытная группа
Эритроциты, млн/мкл.	5,67±0,31	6,0±0,20	4,44±0,25	4,93±0,19	5,97±0,2	5,87±0,3
Лейкоциты, тыс/мкл.	7,0±0,33	7,0±0,2	8,64±1,7	9,53±1	7,06±0,27	6,93±0,3
Лейкоформула, %:						
палочкоядерные нейтрофилы	3,3	3,3	4,3	3,2	2,2	3
сегментоядерные нейтрофилы	39,1	24,2	24	31,6	31	32
эозинофилы	6,3	5,3	6,7	5,3	6,3	6
базофилы	1,3	1,7	1,3	0,3	1	0
моноциты	6	5,3	3,7	3,3	3,1	3,0
лимфоциты	48,0	61,0	60,0±2	56,3±3	56,3	56,0
Лизоцимная активность, %	9,3±1,2	14,3±0,3	8,1±0,7	10,4±1,4	10,8±0,7	14,4±1,1

Продолжение таблицы 7						
Бактерицидная активность, %	9,1±1,1	14,5±0,5	8,2±0,5	8,6±0,2	8,8±0,4	20,6±1,5
ФА индекс	1,160	1,220	1,133	1,196	1,146	1,207
Общий белок, %	7,31±0,16	7,37±0,12	4,45±0,31	5,71±0,23	4,41±0,32	5,59±0,24
Каротин, %	0,462±0,021	0,548±0,024	0,444±0,019	0,538±0,022	0,442±0,018	0,516±0,017

Следующая серия опытов была посвящена изучению влияния пролонгированных препаратов глицина и аланина на физиологическое состояние и резистентность телят молочного периода выращивания. Предпосылкой к проведению опытов послужили работы Белокрылова и сотр. (1986, 1999), в которых выявлена способность ряда аминокислот *in vitro* и на лабораторных животных ускорять дифференцировку предшественников Т-клеток в Т-лимфоциты и усиливать ответ на гетерологические эритроциты.

Таблица 8. Динамика морфологических и иммунобиохимических показателей крови телят после выпаивания смесей аминокислот, II опыт

Показатели	Через 14 дней		Через 30 дней		Через 41 день	
	контроль- ная группа	опытная группа	контроль- ная группа	опытная группа	контроль- ная группа	опытная группа
Эритроциты, млн/мкл.	4,85±0,56	5,08±0,16	5,7±0,3	6,7±0,15	5,63±0,3	5,67±0,2
Лейкоциты, тыс/мкл.	7,95±0,81	8,31±0,83	7,03±0,12	7,27±0,1	7,1±0,26	7,0±0,2
Лейкоформула, %:						
палочкоядерные нейтрофилы	3,3	3,0	3,0	4,0	3,0	2,0
сегментоядерные нейтрофилы	30,0	31,4	28,0	32,0	27,0	29,4
эозинофилы	5,1	7,0	5,0	6,0	6,0	6,0
базофилы	0,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
моноциты	4,3	5,3	4,0	4,0	3,0	3,3
лимфоциты	59,0	53,3	61,0	58,0	60,0	58,3
Лизоцимная активность, %	6,9±0,9	9,5±0,7	9,6±0,9	19,8±1,8	12,3±2,1	13,2±1,6
Бактерицидная активность, %	7,4±1,0	10,0±1,2	13,4±0,7	16,5±0,4	10,9±0,9	13,8±2,3
ФА индекс	1,190	1,227	1,196	1,210	1,210	1,230
Общий белок, %	4,5±0,8	5,1±0,4	4,7±0,2	5,7±0,3	4,3±0,21	5,6±0,2
Каротин, %	0,453±0,015	0,530±0,022	0,452±0,019	0,528±0,025	0,453±0,018	0,520±0,011

Эти аминокислоты входят в состав ряда иммуноактивных пептидов и в основном определяют их активность. Наибольшую активность проявляли в

этом отношении аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аланин, цистеин и др. В детоксикации бензола и афлатоксинов через стимуляцию неспецифической резистентности наибольшую активность проявили глицин, изолейцин, метионин и др. аминокислоты. Авторы считают, что применение препаратов аминокислот более целесообразно по сравнению с пептидами, поскольку последние труднее синтезировать. Однако в своих опытах эти исследователи применяли многократные инъекции растворов аминокислот (в течение 10-15 сут), что делает невозможным использование подобного приёма в животноводстве. Кроме того, как отмечалось выше, опыты проведены на лабораторных животных, или на спленоцитах *in vitro*, что затрудняет установление дозировки препаратов для сельскохозяйственных животных.

При анализе крови телят по показателям неспецифической резистентности через месяц после введения препарата глицина отмечено повышение лизоцимной и бактерицидной активности крови под влиянием обеих доз (табл.9). Более заметно увеличивалась бактерицидная активность. В дальнейшем эти различия сохранились, хотя стали менее выраженными.

Таблица 9. Биохимические показатели и показатели неспецифической резистентности крови у телят после введения глицина (через 1 месяц)

Показатели	Группы телят		
	1-я, контроль	2-я, глицин 40 мг	3-я, глицин 200 мг
Глутатион, мг%:			
общий	33,1±4	37,8±2,6	36,7±0,7
восстановленный	19,8±2,7	27,1±2,1*	23,9±1,3
окисленный	13,3±1,7	10,7±1,2	12,8±1,1
% восстановленного	59,8	71,7	65,7
Гемоглобин, %	10,47±0,38	11,94±0,26*	11,7±0,43
Общий белок, %	5,25±0,14	5,55±0,21	5,88±0,17
Мочевина, мг %	25,8±1,3	26,6±1,8	23,2±1,5
Аминный азот, мг %	4,31±0,17	4,4±0,14	4,17±0,18
Лизоцимная активность, %	17,5±2,8	20,8±1,7	21,3±0,4
Бактерицидная активность, %	27,3±1,6	43,8±3,5*	39,9±2,4*

В крови телят опытных групп через месяц после введения глицина наблюдалось увеличение уровня восстановленного глутатиона, белка и гемоглобина при снижении концентрации мочевины, что характеризует эффективное использование азотистых веществ в организме животных на синтетические цели. Снизилось содержание в крови свободных аминокис-

лот, в основном за счет изолейцина, лейцина, метионина и лизина, использованных, вероятно, на синтез белка. При этом повысилось относительное содержание таких глюкогенных аминокислот, как аспартат, глутамат и аланин, особенно у животных, которым была введена большая доза глицина. Отмеченные изменения в азотистом обмене вряд ли могут быть связаны с непосредственным участием введенного глицина как аминокислоты. Вероятно это явилось результатом изменения в регулирующих системах организма телят под воздействием непрерывно поступающего из места введения глицина. При этом глицин мог выполнять роль своеобразного медиатора, имитируя действие пептидов, включающих эту аминокислоту.

Стимуляция неспецифической резистентности позволила животным легче переносить различные заболевания, наблюдающиеся в этот период, или избежать их. Не исключается действие глицина через стимуляцию выделения соматотропного гормона (Западнюк и др., 1982) или инсулина (Шамберев и др., 1998, 2001), а также антистрессовое влияние (Шамберев и др., 1998), однако, судя по исследованиям других авторов, для такого эффекта необходимы более высокие дозы этой аминокислоты (Балаболкин, 1978).

Результатом повышения неспецифической резистентности телят и изменения направленности азотистого обмена в сторону улучшения синтеза белка в организме явилось увеличение прироста массы тела животных, особенно в первые два месяца после введения препарата (табл. 10).

Таблица 10. Среднесуточный прирост массы тела телят после введения глицина, г

Группы телят	Месяцы опыта				Средн. за 4 мес.
	1-й	2-й	3-й	4-й	
1-я контроль	642	623	475	466	552
2-я глицин 40мг	687	627	493	472	570
3-я глицин 200 мг	609	810	522	527	617

Таким образом, глицин, введенный подкожно телятам в форме пролонгированного препарата, оказал разностороннее действие на организм животных, стимулируя неспецифическую резистентность и процессы роста, вероятно, за счет регулирующих свойств в качестве медиатора в этих процессах.

Направленность воздействия препарата аланина на организм опытных животных была сходной с глицином, но отмечена различная динамика изменения прироста живой массы телят (табл. 11).

Наибольшее увеличение прироста телят наблюдалось в первый месяц опыта и составило 17 и 24% против контроля при введении 40 и 200 мг препарата. За 3-месячный период наблюдения среднесуточный прирост массы тела телят в обеих опытных группах был одинаковым (+12,1 % по сравнению с контролем).

Таблица 11. Среднесуточный прирост массы тела телят после введения аланина, г

Группы телят	Месяцы опыта			Средний за 3 мес
	1-й	2-й	3-й	
1-я, контроль	483±23	420±28	460±33	454
2-я, аланин 40 мг	567±21	467±19	493±25	509
3-я, аланин 200 мг	603±29	403±32	517±28	508

Изменение показателей неспецифической резистентности крови телят опытных групп в сторону увеличения отмечено уже через неделю после введения обеих доз аланина и сохранялось на этом уровне по крайней мере в течение 2-х месяцев (табл.12).

Таблица 12. Морфологические показатели и показатели резистентности крови телят после введения аланина (через 7 дней)

Показатели	Группы телят		
	1-я, контрольная	2-я, аланин 40мг	3-я, аланин 200мг
Эритроциты, млн/мкл	5,08±0,57	5,39±0,23*	5,66±0,30
Лейкоциты, тыс/мкл	6,36±0,33	7,93±0,43*	7,43±1,03
ЦП	1,018±0,74	0,951±0,031	1,038±0,076
Лейкоформула, %:			
палочкоядерные нейтрофилы	4,3	4,3	5,5
сегментоядерные нейтрофилы	19,5	15,8	19,6
эозинофилы	1,5	1,3	2
базофилы	0,1	2,5	1,1
моноциты	1,5	1,1	3,1
лимфоциты	73,1	75,0	68,7
лимфоциты	6,74±0,76	12,26±1,16*	12,85±1,12*
Лизоцимная активность, %	10,83±2,07	19,75±2,75*	17,89±1,21*
Бактерицидная активность, %	46,66±2,66	67,17±2,66*	60,33±1,10*
Фагоцитарная активность, %	1,60±0,16	2,73±0,22*	2,67±0,14*
Фагоцитарный индекс			

Сходные закономерности наблюдались в изменении количества эритроцитов и лейкоцитов в крови телят. Характерным при этом является

увеличение процента лимфоцитов начиная с 15-го дня опыта. В этом отношении результаты опыта имеют сходство с изменениями в опытах Белокрылова и сотр. (1986, 2000), выполненных на мышах. Авторы установили, что аланин и ряд других аминокислот способны ускорять превращения Т-клеток в Т-лимфоциты и усиливать ответ на гетерологичные эритроциты.

О благоприятном влиянии препарата аланина на состояние окислительных процессов в организме животных позволяет судить увеличение уровня гемоглобина, восстановленной формы глутатиона, резервной щелочности, а также общего белка в крови телят опытных групп в течение периода наблюдения. Благодаря повышению неспецифической резистентности телят опытных групп, они в меньшей степени страдали от неблагоприятных воздействий окружающей среды и легче переносили заболевания. Результирующим показателем, как отмечалось выше, было увеличение прироста массы телят, которым инъецировали аланин, за период опыта.

Таким образом, смеси аминокислот на основе глутамата (+аспартат+глицин) и таурина (+глутамат+аспартат+глицин) при пероральном применении новорожденным телятам, способствуют корректровке иммунного статуса этих животных, повышают всасывание питательных веществ, повышают уровень неспецифической резистентности и прирост массы тела. Препараты данных аминокислот могут использоваться как средства метаболической фармакопрофилактики и терапии при желудочно-кишечных болезнях с диарейным синдромом у новорожденных телят. Отмеченные физиологические предпосылки могут быть использованы в практике животноводства путём разработки соответствующих препаратов аминокислот и методик их применения.

Результаты исследований позволяют рекомендовать смеси аминокислот и пролонгированных форм глицина и аланина в качестве адаптогенных и стимулирующих резистентность телят препаратов, профилактирующих их заболевания, вызванные нарушением технологии содержания и рационального кормления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И. Секреция гормона роста в норме и патологии. М., 1978.
2. Белокрылов Г.А., Молчанова И.М., Сорочинская Е.И. Аминокислоты как стимуляторы иммуногенеза. Доклады АН СССР, 1986, 2: 289.
3. Белокрылов Г.А., Попова О.Я., Сорочинская Е.И., Деревина О.М., Коровин Р.Н. Детоксикация аминокислотными и пептидными препаратами бензола и афлатоксана В1 у цыплят. Доклады РАСХН, 2000, 2: 51-52.

4. Захаренко И.А., Засекин Д.А., Мельничук Д.А., Свиноаренко О.И. Энергетический обмен и электролитный состав крови телят при диарее, оральной регидратации и коррекции нарушений обмена веществ. Сельхозбиология, 1992, 2: 88-93.
5. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Зайка М.У., Безверхая И.О. Аминокислоты в медицине. Киев, 1982.
6. Колоскова Е.М., Галочкин В.А. Иммобилизация и изучение кинетики высвобождения низкомолекулярных БАВ из различных пролонгированных форм. В сб.: Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных, Боровск, ВНИИФБиП, 2000: 401
7. Кондрахин И.П. и соавт. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: Справочное изд., М., Агропромиздат, 1985, 287 с.
8. Маркова И.В., Шабалов Н.П. Клиническая фармакология новорожденных. Санкт-Петербург, 1993.
9. Плохинский Н.А. Биометрия. 2-е издание. М.: Изд-во Моск. университета. 1970. 368 с.
10. Харитонов Л.В., Матвеев В.А., Великанов В.И. и др. Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Матер. 3-й междунар. конф., Боровск, 2001: 183-194.
11. Шамберев Ю.Н., Иванов Н.С., Гаврищук В.И. Научные и практические аспекты субстратной регуляции эндокринных желез и повышение продуктивности животных. Тезисы научн. конф.: Теория и практика использования биологически активных веществ в животноводстве. Киров, 1998: 89-90.
12. Шамберев Ю.Н. Актуальные проблемы биологии в животноводстве. Матер. 3-й междунар. конф., Боровск, 2001: 175-182.

**ВЛИЯНИЕ ПРОТЕИНА С НИЗКОЙ РАСПАДАЕМОСТЬЮ В РУБЦЕ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ЖЕЛЕЗ
ВНУТРЕННЕЙ СЕКРЕЦИИ И ПРОДУКТИВНОСТЬ
ОТКАРМЛИВАЕМЫХ БЫЧКОВ**

*В.А. Матвеев, В.П. Галочкина, И.А. Баранова, Т.Н. Дворецкая,
Г.М. Ельченинов*

Лаборатория нейро-эндокринной регуляции обмена веществ и
продуктивности сельскохозяйственных животных

Установлено, что дополнительное поступление в метаболический пул аминокислот в результате введения в рацион протеина с пониженной распадаемостью (кукурузный глютен) не оказало достоверного влияния на концентрацию в сыворотке крови инсулина, кортизола, тироксина и трийодтиронина, уровень которых соответствовал физиологической

норме, но обеспечило изменение интенсивности процессов метаболизма у растущих животных, что в конечном итоге улучшило показатели мясной продуктивности. У бычков опытной группы по сравнению с контролем были выше доля мякоти в туше и значение индекса мясности. В среднем за 3-месячный период опыта от каждого из них дополнительно получено почти по 9 кг мышечной массы.

Введение

В последнее время на повестку дня встал вопрос учета распадаемости протеина и углеводов не только в рационах дойных коров, но и в рационах откармливаемого молодняка. Регуляция снижения распадаемости углеводов и аминокислот в рубце достигается как с помощью сдерживания развития микрофлоры, воздействующей на углеводы и протеин в рубце, так и путем включения в рацион, в частности в комбикорма, ингредиентов с пониженной распадаемостью протеина и углеводов. Это обеспечивает различное поступление субстратов в кишечник и далее в кровяное русло, что соответственно будет влиять на активность желез внутренней секреции и, в первую очередь, на инсулярный аппарат поджелудочной железы. Экономное использование протеина и углеводов, как основных лимитирующих факторов метаболической направленности процессов, происходящих в организме, приводит к повышению накопления мышечной массы и белка в ней. Следовательно, влияя на процессы ферментации в рубце, можно влиять на активность эндокринных желез и, в конечном итоге, на метаболическую направленность обмена веществ в организме. Эти взаимосвязи были показаны нами в ранее проведенных работах (Матвеев и др. 2001).

Использование пробиотика стрептофагина, разработанного в институте, показало возможность управления процессами ферментации питательных веществ корма в рубце на высококонцентратном рационе. Пробиотик стрептофагин, при существенно не меняющемся суммарном содержании летучих жирных кислот в содержимом рубца, значительно снижает долю ацетата и повышает количество пропионата, бутирата, изо-, н-валериата и капроата (Тараканов, 1994), а также повышает поступление крахмала в кишечник. В опыте на откармливаемых бычках, при введении в рацион кукурузы и кукурузного глютенa, наряду с микробным белком, повышалось поступление протеина и крахмала корма в кишечник жвачных животных, что приводило к повышению поступления аминокислот и глюкозы в кровяное русло (Матвеев и др., 2001). В опыте в качестве источника углеводов была использована кукуруза. При использовании данного ра-

циона повысилась интенсивность роста и было получено дополнительное количество мякоти мяса.

Поскольку кукуруза не является традиционным для нашего региона кормом, нами проведен опыт на растущих бычках с использованием комбикорма, в состав которого вводили кукурузный глютен (источник протеина с пониженной распадаемостью в рубце) и ячмень (источник крахмала с повышенной распадаемостью в рубце).

Материал и методы

Исследования проведены в виварии института в периоды доращивания и интенсивного откорма на 10 бычках холмогорской породы с живой массой 213 – 217 кг (при постановке на опыт). По принципу парных аналогов бычки были распределены в две группы, по 5 голов в каждой. В предварительный период (72 дня) животных кормили одинаково, в опытный период (98 дней) – дифференцированно. Разница в кормлении заключалась в различном составе комбикормов. Комбикорм для бычков контрольной группы включал ячмень – 50%, пшеницу – 19%, отруби пшеничные – 10% и шрот подсолнечный – 18%. В комбикорм бычков опытной группы вместо подсолнечного шрота было включено 10% кукурузного глютена и дополнительно 8% ячменя. В остальном комбикорма не отличались. Содержание бычков привязное, кормление 3-х разовое индивидуальное по детализированным нормам, разработанным для интенсивных технологий выращивания и откорма бычков (Наставление по выращиванию..., 1971; Нормы и рационы..., 1985). Рецепты комбикормов и премикса соответствовали таковым, разработанным для выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе "Вороново". Рацион состоял из 2,4 кг злакового сена, 12 кг силоса из отавы трав и 4,5 кг комбикорма. По обменной энергии доля концентратов в рационе составляла 52 %.

В течение эксперимента ежедневно учитывали потребление корма. В 12- (до дифференцированного кормления), 14- и 15-месячном возрасте провели взятие крови пункцией яремной вены до утреннего кормления животных и через 1 и 3 часа после него. В пробах цельной крови определяли концентрацию глюкозы глюкозооксидазным методом (Радченков и др., 1986). В образцах сыворотки крови исследовали содержание гормонов, связанных с метаболизмом, транспортом и использованием глюкозы (инсулина, тироксина, трийодтиронина, кортизола) стандартными методами (Радченков и др., 1985). Интенсивность роста животных оценивали по результатам взвешиваний. Животных взвешивали ежемесячно до утреннего

кормления в течение двух дней подряд и брали среднюю величину между ними. В конце опыта животных убили и провели оценку состава туши.

Математическую обработку полученных данных проводили стандартными методами (Асатиани, 1965).

Результаты и обсуждение

Опыт проведен на достаточно высоком зоотехническом фоне. Условия питания обеспечили высокую интенсивность роста бычков. В среднем за весь период опыта среднесуточный прирост живой массы составил 1379 ± 47 и 1469 ± 79 , причем в опытной группе на 6,5% больше по отношению к контрольной. Относительная скорость роста, вычисленная по формуле С.Броди, в опытной группе также была выше и составила 48,30% (в контрольной 45,67%).

Бычки опытной группы, имевшие более высокую интенсивность роста, получали с комбикормом ингредиенты, содержащие протеин с низкой расщепляемостью в рубце. С повышением поступления в кровь из кишечника аминокислот у бычков опытной группы повышалась не только интенсивность роста, но и снижалось потребление корма. Потребление корма и его питательных веществ снизилось по сравнению с контролем: сена на 1,36, силоса – на 6,65, комбикорма – на 0,22, сухого вещества – на 4,07, сырого протеина – на 6,57 и обменной энергии на 2,61 %. У бычков опытной группы снизилось не только потребление кормов, но и затраты концентратов на 6,54%, кормовых единиц на 8,58 %, сухого вещества на 8,90 %, сырого протеина на 11,27 % и обменной энергии на 8,37% на единицу получаемой продукции.

Результаты контрольного убоя показали, что бычки опытной группы (с большим поступлением из кишечника в кровяное русло аминокислот) имели не только выше интенсивность роста, но и больше мышечной массы в туше (табл.1).

Таблица 1. Показатели мясной продуктивности 14-месячных бычков

Показатели	Группы		% к контролю
	контрольная	опытная	
Убойный выход (без внутреннего жира), %	$50,72 \pm 0,63$	$50,85 \pm 0,91$	100,3
Масса мякоти, кг	$138,6 \pm 3,26$	$147,5 \pm 6,12$	106,4
Мякоти на 100 кг живой массы, %	$38,51 \pm 0,41$	$40,09 \pm 0,84$	104,1
Отношение мякоти к костям	$3,16 \pm 0,08$	$3,73 \pm 0,10$	118,0 ^{xx}
Жира на 100 кг живой массы, %	$2,80 \pm 0,30$	$2,54 \pm 0,24$	90,71
Отношение мякоти к жиру	$13,86 \pm 0,08$	$15,88 \pm 0,10$	114,57 ^{xx}

xx – $P < 0,02$.

У подопытных бычков был достоверно выше (на 3,8 %) процент мякоти в туше, ее обмускулиность (процент мякоти от живой массы), коэффициент мясности (отношение мякоти к костям) и достоверно ниже на 11,97% процент костей в туше. В опытной группе был так же ниже на 8,86% процент жира в туше и на 9,29 % его выход, но выше отношение мякоти к жиру на 14,57%. В работе Акчуриной и др., (2000), проведенной в Институте мясного скотоводства, показано, что введение в рацион мясокостной муки (с пониженной распадаемостью протеина) способствовало повышению количества мякоти от каждого бычка и улучшило другие показатели мясных качеств туш. Повышение концентрации обменной энергии с 9,5 до 10 МДж/кг обеспечило еще большее накопление мякоти в туше. В нашем же опыте, при равном содержании обменной энергии в рационе, понижение распадаемости протеина способствовало повышению накопления мышечной массы в туше на 8,9 кг. При дополнительном введении в рацион корма с пониженной распадаемостью углеводов в рубце этот показатель повысился до 11,9 кг (Матвеев и др., 2001), что подтверждает влияние не только уровня энергии в рационе, но и доступности ее источников для использования микрофлорой рубца.

В ранее проведенных исследованиях нами было показано, что животные, отличающиеся повышенной интенсивностью роста и большим наращиванием мышечной массы, обладают более высокой функциональной активностью инсулярного аппарата. В данном опыте такой закономерности не выявлено. До начала дифференцированного кормления у бычков опытной группы наблюдалась тенденция к более высокому содержанию инсулина в сыворотке крови, по сравнению с контролем, как до приема корма, так и после него (табл. 2). Через 2 месяца дифференцированного кормления у этих же бычков отмечена тенденция к более низкому содержанию инсулина. В конце опыта базальный уровень инсулина и его концентрация в крови бычков через час после приема корма не имели различий между группами.

Ранее полученные нами данные свидетельствуют, что базальная концентрация инсулина в крови бычков и его уровень после приема корма в значительной мере зависят от уровня кормления животных. В данном опыте не было различий между группами по уровню кормления. Соответственно, не наблюдалось существенных различий и по содержанию инсулина в крови. Концентрация инсулина в крови бычков обеих групп существенно увеличивалась после приема корма (табл. 2), что свидетельствует о достаточно высоком уровне обеспеченности их питательными веществами и подтверждается величиной среднесуточного прироста живой массы.

Таблица 2. Концентрация инсулина в сыворотке крови бычков, мкед/л

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
12-месячный возраст (исходные данные)			
Контрольная	6,1±0,75	7,9±0,76	8,3±0,91
Опытная	8,9±1,03	9,0±1,56	9,2±1,05
% к контролю	145,9	113,9	110,8
14-месячный возраст			
Контрольная	12,0±2,34	19,9±2,17	17,3±2,13
Опытная	17,2±1,38	15,7±2,23	14,1±1,76
% к контролю	142,9	78,9	81,5
15-месячный возраст			
Контрольная	13,5±2,03	24,8±2,85	15,8±2,18
Опытная	13,5±1,61	24,4±2,71	18,2±2,27
% к контролю	100,0	98,4	115,2

Концентрация глюкозы в крови бычков как до приема корма, так и после него существенно не различалась между группами животных (табл. 3). Можно предположить, что обмен веществ у них проходил на фоне одинакового обеспечения метаболизма глюкозой.

Таблица 3. Концентрация глюкозы в крови бычков, мг%

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
12-месячный возраст (исходные данные)			
Контрольная	65,4±1,36	62,6±1,12	65,4±0,43
Опытная	66,8±1,80	62,0±1,27	65,9±0,79
% к контролю	102,1	99,0	100,8
14-месячный возраст			
Контрольная	66,3±1,68	59,0±1,38	63,5±0,63
Опытная	65,1±5,89	60,1±1,97	65,3±1,46
% к контролю	97,1	101,9	102,8
15-месячный возраст			
Контрольная	63,2±3,89	59,4±0,77	68,9±1,31
Опытная	63,9±3,16	60,1±1,92	65,8±1,76
% к контролю	101,1	101,2	95,5

Несмотря на увеличение содержания инсулина в сыворотке крови бычков обеих групп, через час после приема корма концентрация глюкозы снижалась незначительно. Это свидетельствует о том, что условия питания животных соответствовали физиологическим потребностям их организма.

Как в начале опыта, так и в конце эксперимента у бычков опытной группы по сравнению с контролем в большинстве случаев была выше кон-

центрация кортизола в сыворотке крови (табл. 4), что свидетельствует о повышенной функциональной активности коры надпочечников у них. Эти различия по уровню гормона наблюдались и в исходный период опыта. Поэтому мы рассматриваем этот факт как результат индивидуальных особенностей животных опытной группы, а не как следствие дифференцированного кормления.

Таблица 4. Концентрация кортизола в сыворотке крови бычков, нМоль/л

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
12-месячный возраст (исходные данные)			
Контрольная	23,8±12,0	12,6±5,8	8,2±6,1
Опытная	53,4±18,5	24,3±14,9	28,3±9,2
% к контролю	224,4	192,9	345,1
15-месячный возраст			
Контрольная	53,3±23,5	12,4±3,0	10,7±4,2
Опытная	23,9±5,6	20,3±3,7	20,0±13,7
% к контролю	44,8	163,7	186,9

В 12-месячном возрасте перед началом дифференцированного кормления в сыворотке крови бычков опытной группы по сравнению с контролем наблюдалась тенденция к более низкому уровню тироксина (табл. 5) и трийодтиронина (табл. 6).

Таблица 5. Концентрация тироксина в сыворотке крови бычков, нМоль/л

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
12-месячный возраст (исходные данные)			
Контрольная	95,5±21,82	92,8±3,64	100,2±20,31
Опытная	73,2±3,64	72,0±4,39	77,2±3,60
% к контролю	76,6	77,6	70,1
15-месячный возраст			
Контрольная	108,2±21,99	76,4±12,42	83,0±17,17
Опытная	124,8±16,69	80,8±5,39	88,6±12,26
% к контролю	115,3	105,8	106,7

После 3-месячного периода дифференцированного кормления различия между группами животных по уровню тиреоидных гормонов уменьшились. Следовательно, по сравнению с исходным периодом у бычков опытной группы в течение опыта более значительно увеличилась функциональная активность щитовидной железы, что в первую очередь

отразилось на увеличении в сыворотке крови концентрации трийодтиронина, который является наиболее активным тиреоидным гормоном. В частности, базальный уровень трийодтиронина в сыворотке крови животных опытной группы в 15-месячном возрасте был выше, чем в 12-месячном возрасте на 164,4 % ($P < 0,01$). В этот период у бычков обеих групп был высокий среднесуточный прирост живой массы.

Таблица 6. Концентрация трийодтиронина сыворотке крови бычков, Моль/л

Группа	Время после приема корма, часы		
	0	1	3
12-месячный возраст (исходные данные)			
Контрольная	4,72±1,84	4,94±2,15	5,36±2,05
Опытная	3,60±0,95	3,9±0,68	3,72±0,73
% к контролю	76,3	78,9	69,4
15-месячный возраст			
Контрольная	6,40±1,69	5,52±0,90	5,40±1,37
Опытная	9,52±0,78	5,40±0,28	5,26±0,81
% к контролю	148,7	97,8	97,4

Повышение функциональной активности щитовидной железы в этот период способствовало активизации энергетического обмена у животных и, соответственно, лучшему обеспечению синтетических процессов энергией.

Заключение

Повышенное поступление из кишечника в кровяное русло аминокислот и повышенный синтез глюкозы из аминокислот за счет введения в рацион бычков, выращиваемых на мясо, кормов со слабо расщепляемым протеином, способствовали повышению интенсивности роста, большему наращиванию мышечной массы, улучшению качества продукции и повышению биоконверсии корма в продукцию.

Видимо, с повышением интенсивности роста и наращивания мышечной массы повышается рецепция инсулина и использование глюкозы мышечной и жировой тканями. Установившаяся на определенном уровне функциональная активность эндокринных желез на фоне скорректированного поступления метаболитов из желудочно-кишечного тракта и печени в кровяное русло и обеспечила повышенную интенсивность роста и наращивание мышечной массы бычков.

В связи с этим, для повышения интенсивности роста бычков и увеличения мякоти в их туше, в комбикормах для молодняка крупного рогатого скота, выращиваемого на мясо, необходимо увеличивать долю кормов с низкой распадаемостью протеина в рубце.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акчурина Ф.И., Яруллин Р.Р., Фасхутдинов Р.В. Влияние биотрина на мясную продуктивность бычков. Зоотехния, 2000, 10: 12-14.
2. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М.: Наука, 1965, 543.
3. Балаболкин М.И. Эндокринология. М.: Универсум паблишинг, 1998. 598 с.
4. Галяс В.Л. Биология тварин, 1999, 1, 1: 79-83.
5. Матвеев В.А., Галочкина В.П., Еримбетов К.Т. и др. Мат. науч.-прак. конф.: Новое в приготовлении и использовании комбикормов и балансирующих добавок. Дубровицы, 2001, 66-68.
6. Наставление по технологии выращивания и откорма молодняка крупного рогатого скота в промышленном комплексе на 9880 голов. М.: Колос, 1971. –30.
7. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: Справочное пособие. /Под ред. А.П. Калашникова, Н.И. Клейменова, В.Н. Баканова и др. М.: Агропромиздат, 1985. -352.
8. Радченков В.П., Матвеев В.А., Аверин В.С. и др. Определение потенциала функции инсулярного аппарата поджелудочной железы у молодняка крупного рогатого скота. (Методические указания). Боровск, 1986: 9.
9. Радченков В.П. и др. Определение гормонов в крови крупного рогатого скота, свиней и их гормональный статус. (Методические указания). Боровск, 1985: 74.
10. Тараканов Б.В. Регуляция микробиологических процессов в рубце жвачных животных бактериофагами *Streptococcus bovis*. Ж. Микробиология, 1994, 63, 4: 657 – 667.

О ВЗАИМОСВЯЗИ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ ВИТАМИНА Е В ОРГАНИЗМЕ СВИНЕЙ С УРОВНЕМ ЖИРА В ИХ РАЦИОНЕ

В.И. Дудин

Лаборатория биологически активных веществ и
сертификации кормов

Изучали потери α -токоферола в печени свиней, получавших разное количество внутреннего топленого свиного сала (лярд) в рационе в процес-

се 3-суточной инкубации ее гомогената при комнатной температуре. Согласно полученным данным, наименьшее количество общего (натив + добавка в гомогенат) α -токоферола расходовалось в процессе инкубирования печени свиней с наибольшим уровнем жира в комбикорме, что сопровождалось самым высоким образованием α -токоферилхинона. Обнаружено полярное вещество с УФ-спектром поглощения, подобным α -токоферилхинону с батохромным сдвигом, количество которого в процессе инкубирования гомогената печени увеличивалось, что стимулировалось добавками фруктозо-1,6-бисфосфата и блокировалось включением в среду инкубации фторида натрия.

Введение

Во многих наших исследованиях, проведенных на цыплятах с применением радиоиндикаторного метода (Дудин, Двинская, 1983), обнаружилось, что в целом ряде случаев происходит значительное увеличение включения меченого α -токоферола с 8-ми до 24-часовой экспозиции, особенно в мышечную ткань. Это вряд ли может быть следствием транслокации α -токоферола из других тканей. Скорее всего, здесь имеет место ковалентное связывание α -токоферола по месту фенольного гидроксила, что может оказаться весьма важным для регуляции уровня свободного α -токоферола в тканях. Для проверки этого предположения провели эксперимент на свиньях с разным количеством лярда в рационе с применением метода инкубирования гомогенатов печени в присутствии добавок экзогенного α -токоферола, препарата 1,6-бисфосфата фруктозы и бензилпенициллина. Другой эксперимент был поставлен в целях выяснения динамики в связи со временем инкубирования гомогената печени свиней концентрации обнаруженного полярного вещества, имеющего максимум поглощения УФ-света при 280 нм.

Материал и методы

Опыты провели в условиях физиологического двора института на помесных свиньях (ландрас х крупная белая) с 65-суточного до 204-суточного (опыт 1) и с 84-суточного до 105-суточного возрастов (опыт 2). В опыте 1 животных разделили на 3 группы по 12 голов в группе на основе принципа парных аналогов. Различия между группами состояли в энергетическом питании. Эти различия создавали в основном за счет добавок свиного жира (табл. 1).

Таблица 1. *Ингредиентный состав комбикормов в период откорма (%)*

Ингредиенты	Группы		
	1	2	3
Кукуруза желтая	10,0	15,0	20,0
Пшеница	10,0	10,0	10,0
Ячмень	50,0	43,3	36,5
Шрот соевый	8,0	8,2	8,5
Шрот подсолнечниковый	5,0	5,0	5,0
Мука рыбная	2,0	2,0	2,0
Отруби пшеничные	12,0	12,0	12,0
Жир свиной	–	1,5	3,0
Трикальцийфосфат	1,0	1,0	1,0
Мел кормовой	0,5	0,5	0,5
Соль	0,5	0,5	0,5
Премикс КС-4	1,0	1,0	1,0

Различия между группами по большинству нутриентов были незначительными, за исключением сырого жира (Гр.1 – 32,4 г, Гр.2 – 41,1 г, Гр.3 – 58,3 г/кг корма).

Для экспериментов с инкубированием отбирали печень 204-суточных свинок, измельчали, добавляли свободный d,l- α -токоферол (56 мкг/г ткани), фруктозо-1,6-дифосфат тетрациклогексиламмониевую соль (17 мг/г ткани), бензилпенициллин (8 мг/г ткани). Инкубировали в закрытых пластиковых контейнерах при комнатной температуре в течение 3-х суток.

В опыте 2 использовали 4-х свинок, в течение 3-х недель получавших d,l- α -токоферилхинон (50 мг/кг корма). Печень измельчали до фаршеобразного состояния. К гомогенату каждой печени добавляли α -токоферол в количестве 100 мкг/г в форме эмульсии в 1% (в/о) растворе твина-80 в 20% растворе этанола в воде (5 мл приготовленной формы на 100 г печеночного гомогената). После этого гомогенат каждой печени разделили на 3 части, одна из которых была контрольной. Ко 2-й части добавляли монокальциевую соль фруктозо-1,6-бисфосфата в количестве 8 мкМ/г, а к 3-ей части – фтористый натрий в количестве 50 мкМ/г гомогената. Инкубирование проводили при 37°C в запаянных полиэтиленовых пакетиках, которые вынимали из термостата и помещали в рефрижератор через 20, 120, 240, 480 и 960 минут.

Альфа-токоферол определяли с помощью прямофазной ВЭЖХ (Дудин, 2001).

При поиске продуктов превращения α -токоферола в процессе инкубирования также применяли ВЭЖХ. Синтез α -токоферилхинона и диме-

ров α -токоферола проводили по известным прописям (E. Rao, Krick, 1980, Nelan et al., 1962).

Результаты и обсуждение

Концентрацию α -токоферола определяли до (табл. 2) и 3-е суток спустя после стояния образцов в темноте при комнатной температуре в укупоренных пластиковых контейнерах (табл. 3), выражая ее в мкг/г нативной ткани печени.

Таблица 2. Исходная концентрация α -токоферола в печени свиней (натив + добавка)

№ животного	Группы		
	1	2	3
1	66,54	69,45	68,99
2	63,51	63,62	70,00
3	67,68	64,00	66,31
4	64,55	63,15	67,03
Среднее	65,60 $\pm$ 0,96	65,05 $\pm$ 1,48	67,03 $\pm$ 0,98

Различия между группами по суммарной исходной концентрации α -токоферола в гомогенате печени были очень небольшими и статистически недостоверными ($P = 0,155-0,768$) и вряд ли могли сколько-нибудь заметно отразиться на результатах опыта.

Таблица 3. Концентрация α -токоферола в печени после 3-суточной инкубации при комнатной температуре (мкг/г)

№ животного	Группы		
	1	2	3
1	32,66	45,15	45,06
2	23,68	23,42	47,33
3	35,46	22,70	44,65
4	28,19	13,80	34,97
Среднее	30,00 $\pm$ 2,59	26,27 $\pm$ 6,67	43,00 $\pm$ 2,74

Согласно анализа результатов таблицы 3, наибольшие количества α -токоферола были характерны для свиней с самым большим уровнем лярда в рационе, в одном случае разница статистически достоверна (Гр.1 vs Гр.3, $P = 0,014$), в другом близка к достоверности (Гр.2 vs Гр.3, $P = 0,059$).

На основе исходной и конечной концентраций α -токоферола мы рассчитывали его потери в процессе инкубирования (табл. 4).

Таблица 4. Потери α -токоферола в гомогенатах печени в процессе 3-суточного инкубирования в закрытых контейнерах при комнатной температуре (%)

№ животного	Группы		
	1	2	3
1	50,92	34,99	34,69
2	62,71	63,18	32,39
3	47,65	64,53	32,66
4	56,33	78,15	47,03
Среднее	54,40 $\pm$ 3,30	60,21 $\pm$ 9,06	36,64 $\pm$ 3,48

Различия в потерях α -токоферола в процессе инкубирования между группами по достоверности напоминают таковые, которые отмечены в отношении концентрации токоферола в печени в конце инкубирования. При этом наименьшими потерями отличались свиньи 3 группы, получавшие наибольшее количество кормового жира. Эти различия в одном случае были статистически достоверными (Гр.1 vs Гр.3, $P = 0,010$) в другом близкими к достоверности (Гр.2 vs Гр.3, $P = 0,052$).

В качестве главного вывода из вышеизложенного вытекает, что с повышением пероксидабельности рациона потери α -токоферола в гомогенатах печени после некоторого предела очень заметно уменьшаются. Здесь вполне можно предположить существование механизма создания высокой концентрации α -токоферола в тканях в условиях угрожающих антиокислительному статусу организма.

В качестве одного из принципов этого механизма может выступать синтез-распад специфического производного α -токоферола с вовлечением в процесс его фенольного гидроксила. Этим можно объяснить неудачные попытки создать высокие концентрации α -токоферола в организме свиней, даже при нормальном всасывании и массивном супердозировании (Гришук, 1995), в отличие от цыплят, которые адекватно реагируют на супердозирование (Дудин и др., 1991) и у которых концентрация α -токоферола в тканях может снижаться настолько быстро, что очень часто возникают спонтанные заболевания Е-витаминной недостаточности.

В хлороформных экстрактах мы не нашли больших количеств α -токоферилхинона и совсем не обнаружили продуктов димеризации α -токоферола. Вместе с тем, с помощью ацетоновой экстракции печени мы установили, что практически на 80-90% ее α -токоферол превращается в α -

токоферилхинон (табл. 5). Подобные результаты мы уже получили ранее на цыплятах (Дудин и др., 1986) с применением меченого тритием α -токоферола.

Таблица 5. Концентрация α -токоферилхинона в печени (мкг/г) и его отношение к потерям α -токоферола в результате 3-суточной инкубации гомогената органа при комнатной температуре

№ животного	Группы		
	1	2	3
α -токоферилхинон (экстракция ацетоном)			
1	33,88	24,30	23,93
2	39,83	40,20	22,67
3	32,22	41,30	21,66
4	36,36	49,35	32,06
Среднее	35,57 $\pm$ 1,65	38,79 $\pm$ 5,24	25,08 $\pm$ 2,37
α -токоферилхинон/потери α -токоферола мкг/мкг			
1	0,80	0,79	0,88
2	0,77	0,79	0,85
3	0,88	0,73	0,85
4	0,69	0,74	0,88
Среднее	0,78 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,01

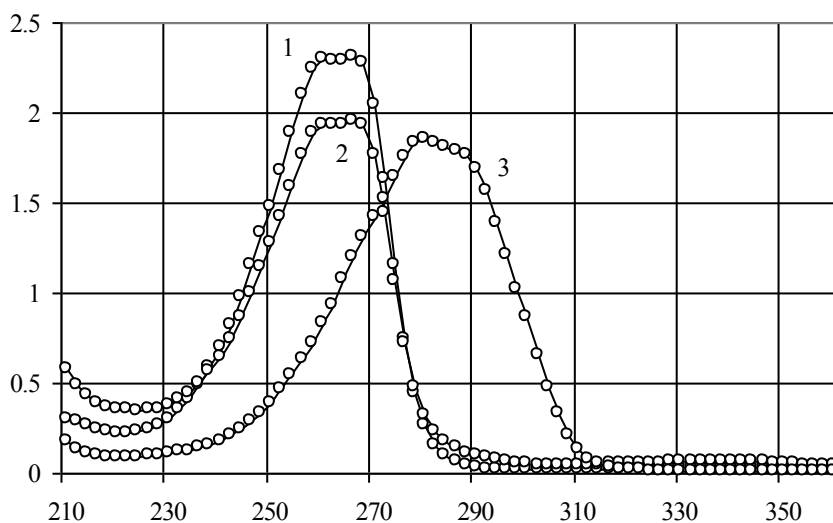


Рис. 1 УФ-спектры α -токоферилхинона (1 - стандарт, 2 - проба) и полярного вещества (3) (y - поглощение, x - длина волны, нм).

Согласно результатам, представленным в таблице 5, у свиней, получавших наибольшие добавки лярда, эффективность окисления α -токоферола в α -токоферилхинон оказалась самой высокой и в одном случае статистически достоверной (Гр.2 vs Гр.3, $P = 0,0017$).

Наряду с высокими количествами α -токоферилхинона в автолизатах обнаружались небольшие количества полярного вещества с подобной, но батохромно сдвинутой полосой поглощения УФ-света (максимум поглощения – 280 нм) (рис. 1), а также невысокие концентрации вещества по УФ спектру поглощения, аналогичного продукту превращения α -токоферола в среде уксусной кислоты в результате открытой нами реакции, возникающей в процессе взаимодействия металлического цинка с концентрированной соляной кислотой (рис. 2), но несколько более полярное, чем оно (720 мкл vs 580 мкл).

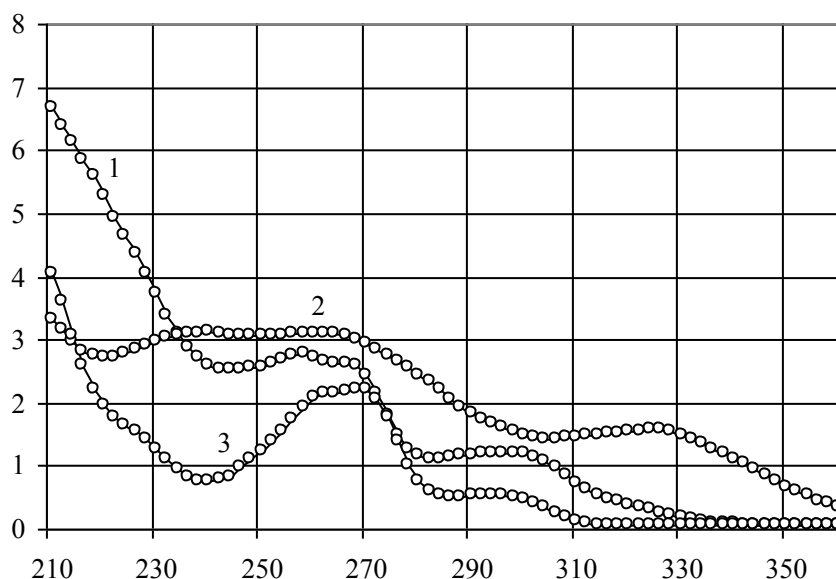


Рис. 2 УФ-спектры продукта превращения α -токоферола в среде уксусной кислоты в результате реакции металлического цинка с концентрированной соляной кислотой (1), вещества, выделенного из ацетонового экстракта автолизата печени (опыт 1)(2) и димера α -токоферола (3)(у - поглощение, х - длина волны, нм).

Как видно из результатов опыта 2 (табл. 6), во всех вариантах в первые 20 минут инкубирования происходит связывание добавленного α -

токоферола гомогенатами печени так, что около 20% его не экстрагируется ацетоном. В дальнейшем в контроле происходит использование α -токоферола, в частности на образование α -токоферилхинона. Стимуляция гликолиза за счет добавок фруктозо-1,6-бисфосфата несколько увеличивает связывание и последующий расход, а добавки NaF повышают связывание и последующее освобождение α -токоферола.

Концентрации α -токоферилхинона и s280 претерпевают аналогичные изменения независимо от примененных воздействий. В контроле и при добавках фруктозо-1,6-бисфосфата происходит резкое увеличение концентрации этих соединений между 8-ю и 16-ю часами инкубации. Добавки же NaF практически блокируют образование указанных веществ.

Таблица 6. Концентрация α -токоферола, α -токоферилхинона и неизвестного вещества s280 в процессе автолиза печени свиней и в связи с добавками фруктозо-1,6-бисфосфата или фторида натрия (мкг/г нативного вещества, s280 выражен как α -токоферол)

Вариант	Время инкубирования				
	20	140	240	480	960
α -токоферол					
1	73,74 $\pm$ 8,99	73,53 $\pm$ 8,30	69,54 $\pm$ 8,12	66,25 $\pm$ 7,53	60,47 $\pm$ 2,76
2	64,87 $\pm$ 0,37	66,14 $\pm$ 2,99	68,15 $\pm$ 3,04	61,20 $\pm$ 1,99	54,50 $\pm$ 1,04
3	58,01 $\pm$ 1,48	59,08 $\pm$ 0,70	57,76 $\pm$ 0,34	64,48 $\pm$ 4,27	68,38 $\pm$ 6,88
α -токоферилхинон					
1	1,86 $\pm$ 1,15	0,88 $\pm$ 0,26	0,79 $\pm$ 0,09	0,72 $\pm$ 0,10	6,41 $\pm$ 0,77
2	1,71 $\pm$ 0,09	1,43 $\pm$ 0,28	1,89 $\pm$ 1,39	1,73 $\pm$ 0,70	7,18 $\pm$ 0,27
3	1,40 $\pm$ 0,20	1,27 $\pm$ 0,39	1,25 $\pm$ 0,19	1,08 $\pm$ 0,10	1,49 $\pm$ 0,40
s280					
1	0,81 $\pm$ 0,14	0,47 $\pm$ 0,14	0,33 $\pm$ 0,05	0,99 $\pm$ 0,00	5,80 $\pm$ 0,76
2	1,99 $\pm$ 0,01	1,48 $\pm$ 0,05	1,23 $\pm$ 0,28	4,56 $\pm$ 1,14	15,23 $\pm$ 3,42
3	0,15 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00	0,39 $\pm$ 0,15	1,92 $\pm$ 0,58

Примечание: 1 – контроль, 2 – +ФБФ, 3 – +NaF

Закключение

Таким образом, в эксперименте на свиньях с инкубированием печени с экзогенным α -токоферолом при комнатной температуре в течение 3-х суток в присутствии фруктозо-1,6-бисфосфата или NaF обнаружился самый низкий уровень потерь α -токоферола в печени животных с наибольшим количеством жира в рационе, что компенсировалось в какой-то степени усилением образования α -токоферилхинона. Помимо этого, еще

раз подтвердилась правомочность предположения о том, что у млекопитающих животных α -токоферол в заметных количествах может существовать в ткани печени, возможно в виде плохо гидролизующегося *in vitro* производного, уходя, таким образом, из под наблюдения исследователей и появляясь вновь в критических для антиокислительного статуса организма ситуациях. Обнаруженное вещество с максимумом поглощения УФ-света при 280нм может оказаться промежуточным соединением при синтезе из α -токоферилхинона кетонного производного (2) и идентифицироваться как 2,3-диол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дудин В.И., Двинская Л.М. Метаболизм альфа-токоферола в организме цыплят разного возраста. Бюллетень ВНИИФБиП, 1983, 4: 63-65.
2. Дудин В.И. Метаболизм альфа-токоферола в организме сельскохозяйственных животных. Дис... д.б.н., Боровск, 2001.
3. E.Rao G.H.R., Krick Th.P., White J.G. Preparation, separation and characterization of vitamin E quinone. J.Chromatogr., 1980, 296, 3: 506-511.
4. Nelan D.K., Robeson C.D. The oxidation products from alpha-tocopherols and potassium ferricyanide and its reaction with ascorbic and hydrochloric acids. J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 15: 2963-2966.
5. Грищук С.В. Метаболизм альфа-токоферола у поросят раннего возраста Автореф. канд. дисс., Боровск, 1995.
6. Дудин В.И., Пьянкова Е.В. Взаимосвязь метаболизма витамина Е в печени и селезенке у цыплят-бройлеров в связи с возрастом. Проблемы физиологии, биохимии, биотехнологии и питания сельскохозяйственных животных. Боровск, 1999: 203-204.
7. Дудин В.И., Двинская Л.М. Участие альфа-токоферола в синтезе кислых липидов у цыплят. Сельскохозяй. биология, 1986, 5: 101-105

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ

Е.Я. Езерская, В.А. Галочкин
Лаборатория иммунобиотехнологии

Авторами разработана тест-система иммуноферментного анализа мышечных белков крупного рогатого скота и свиней.

Введение

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) вошел в широкую лабораторную практику во всем мире после разработки в 1959 году Yalow и Berson метода радиоиммунного анализа (РИА). Engvall и Perlmann (1971) и независимо от них Van Weemen и Schuurs (1971) применили принцип радиоиммуноанализа, заменив мечение антигенов радиоактивными изотопами на ферментные индикаторы. Авторы разработали способ конъюгирования антигенов с ферментом (щелочной фосфатазой), в результате которого комплекс антигена с ферментом сохранял иммунологическую реактивность антигена и каталитическую активность фермента. Метод получил сокращенное название ELISA (от английского Enzyme Linked Immunosorbent Assay, что означает в буквальном переводе фермент-связанный иммуносорбционный анализ). Метод по точности, чувствительности, специфичности и воспроизводимости не уступал РИА и был безопасен для исследователя. С тех пор, и до наших дней, иммуноферментный анализ является одним из наиболее активно развивающихся методических направлений и прочно занял лидирующие позиции в аналитическом оснащении всех ведущих лабораторий мира. С его помощью определяется чрезвычайно обширный спектр антигенов и антител. Многочисленные разновидности метода широко внедрены в различные области медицины, сельского хозяйства, охраны окружающей среды, пищевой и биологической промышленности.

ИФА оказался исключительно ценным инструментом в диагностике самых разнообразных заболеваний и весьма полезным средством в идентификации отдельных компонентов в сложных смесях. Одним из плодотворных практических приложений метода стало его использование в анализе пищевых продуктов.

В Российской Федерации имеется ряд хорошо оснащенных лабораторий, в которых на основе методов геномной дактилоскопии и полимеразной цепной реакции может быть определена видовая и индивидуальная принадлежность любой ткани. В развитых странах мира на вооружение специализированных лабораторий, осуществляющих санитарный контроль мясопродуктов, начиная с 80-х годов XX века, стали поступать самые разнообразные методы для определения видовой принадлежности мяса. Весь имеющийся арсенал специально разработанных и разрабатываемых методов основан на использовании дорогостоящего оборудования, техника проведения анализа требует сложных и длительных процедур, специфических реагентов и высококвалифицированного персонала. За рубежом данные анализы проводятся,

по настоящее время, только в строго специализированных лабораториях. Разработан такой метод и в нашей стране.

Проблема видовой идентификации мяса и мясопродуктов (как натуральных, так и подвергнутых различным режимам термо- и барообработки) потенциально может быть решена с использованием принципиальных подходов, основанных на анализе отдельных групп веществ:

ароматические вещества (запах мяса); липиды; инертные белки; белки, обладающие ферментативной активностью (ферменты); нуклеиновые кислоты.

Либо, идентификация основывается на использовании различных методических приемов анализа:

физические; хроматографические; электрофоретические; энзимологические; иммунологические; иммуноферментные; сиквенс-методы (определение нуклеотидной и аминокислотной последовательности в нуклеиновых кислотах, пептидах и белках). Полная характеристика использования каждого из перечисленных подходов, их реальные и потенциальные разрешающие возможности, даны нами ранее (Езерская, Галочкин, 1999).

Задача настоящей работы – создание и апробация метода иммуноферментного анализа, позволяющего вести простой и надежный контроль мясных продуктов по наличию в них мяса различных видов сельскохозяйственных животных, в частности, свинины и говядины.

Материал и методы

Метод выделения видоспецифичных мышечных антигенов. Основные компоненты мышечной ткани всех видов животных и птицы – белки актин и миозин. У этих белков отсутствует видовая иммунологическая специфичность. Следовательно, поэтапность решения поставленных нами задач состояла в том, что, прежде всего, необходимо выявить саркоплазматические компоненты, обладающие видовыми иммунологическими различиями. Затем надо их препаративно выделить, очистить, выработать на них антитела, очистить полученные антитела от иммуноглобулинов, способных перекрестно реагировать с белками других видов животных и, с использованием этих, мовалентных антител создать тест-систему ИФА, позволяющую безошибочно определять мышечные белки требуемого вида животных в присутствии белков животных других видов.

Для достижения поставленных целей из водных экстрактов мышечной ткани крупного рогатого скота и свиней методом поэтапного осаждения сульфатом аммония при ступенчатом понижении рН выделяли видоспецифичные водорастворимые мышечные антигены. Для этого 250 г

мышечной ткани гомогенизировали с 500 мл физиологического раствора в течение 3 – 5 минут, после чего оставляли на 1 час при комнатной температуре для экстрагирования. Центрифугировали 40 мин при 5000 g (4°C). После этого супернатант фильтровали через фильтровальную бумагу для удаления жира. Фильтрат доводили дистиллированной водой до объема 950 мл и добавляли 50 мл 1 М раствора ацетата натрия.

К полученному раствору медленно, при перемешивании, добавляли 351 г кристаллического сульфата аммония (достигая насыщения 55 %) и оставляли на ночь в холодильнике для формирования осадка. Повторяли центрифугирование в том же режиме (40 мин при 5000 g, 4°C), после чего удаляли образовавшийся осадок, а рН супернатанта доводили до 4,9 ледяной уксусной кислотой. Жидкость оставляли на ночь в холодильнике и вновь центрифугировали, удаляли осадок, доводили рН раствора до 3,7 ледяной уксусной кислотой и снова оставляли на ночь при 4°C. После этого осадок удаляли центрифугированием. Затем к надосадочной жидкости при осторожном перемешивании добавляли 347 г кристаллического сульфата аммония, до получения 100% насыщения. Раствор оставляли на 2 суток в холодильнике для лучшего формирования осадка. По истечении указанного срока проводили центрифугирование (1 час при 5800 g (4°C). Надосадочную жидкость декантировали, осадок суспендировали в 60 мл дистиллированной воды и нерастворившиеся остатки удаляли центрифугированием (40 мин при 12000 g (4°C). Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды в течение ночи. Образовавшийся осадок опять удаляли центрифугированием и супернатант лиофильно высушивали.

Полученную таким образом группу белков, в которую входили ферменты гликолиза, креатинкиназа, миоглобин и некоторые другие минорные саркоплазматические компоненты, использовали в качестве антигенов для иммунизации кроликов. Первичную иммунизацию проводили с использованием полного адьюванта Фрейнда. Раствор выделенной группы белков в физиологическом растворе в количестве 0,4 мл тщательно эмульгировали в 1,2 мл адьюванта. Животных иммунизировали еженедельно, подкожно во множественные точки спины. Доза вводимого антигена составляла 400 мкг на голову за каждый цикл иммунизации (Кэтти, Райкундалия, 1991). Через 14 дней после последней иммунизации брали кровь из краевой вены уха для определения титра антител. Для получения гипериммунных сывороток проводили бустерные инъекции ежемесячно, используя неполный адьювант Фрейнда. Из сыворотки крови получали препарат с повышенным содержанием IgG методом трехкратного осаждения сульфатом аммония. Полученные «грязные» антитела хранили в виде сульфатного осадка в плотно закрытых пробирках при 4°C. Хранение в те-

чение 2-х лет не вызывало сколько-нибудь заметного падения титра антител.

Метод очистки антител. Полученные таким образом препараты антител, даже при высоком титре в крови, не обладали необходимой специфичностью. Они реагировали с экстрактами мышечной ткани других видов животных и, следовательно, были непригодны для конструирования тест-систем ИФА, позволяющих надежно вести дифференцированное определение белков одних видов животных в присутствии белков, принадлежащих другим видам. Необходима была их дальнейшая очистка с целью избавления от перекрестно реагирующих антител. Очистку осуществляли методом «истощения». Для истощения антител готовили гомогенаты мышечной ткани животных соответствующего вида (Coons, Kaplan, 1950). Приготовленный, частично очищенный и лиофильно высушенный гомогенат хранили при -20°C .

Для истощения антител к одному объему гомогената добавляли два объема раствора антител, и пробирку с суспензией инкубировали в течение 3-6 часов при комнатной температуре, осторожно вращая на роторной мешалке. Затем суспензию центрифугировали 25 мин при 10000 g. Супернатант отделяли, а осадок ресуспендировали в 3 мл 20 mM Трис-HCl солевого буфера (0,15 M NaCl) pH 7,4 (ТСБ) и снова инкубировали на роторной мешалке при комнатной температуре 1 ч. Процедуру центрифугирования повторяли, а супернатанты, полученные после первого и второго центрифугирования, объединяли. Во избежание контаминации супернатанта бактериальной микрофлорой во все растворы добавляли азид натрия до концентрации 0,1 %.

Осадок гомогената мышечной ткани регенерировали, отмывая его 3 мл 0,1 M Na-цитратного буфера pH 2,2. Суспензию центрифугировали при тех же условиях (25 мин при 10000 g), после чего осадок отмывали 5 мл ТСБ, центрифугировали и хранили до следующего цикла.

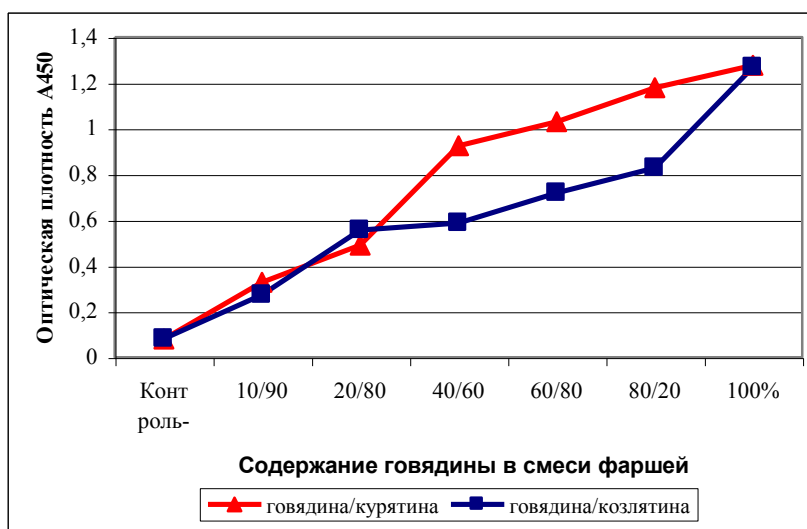
Иммуноферментный анализ. Для анализа специфичности аффинно очищенных кроличьих антител применяли метод твердофазного, гетерогенного, неконкурентного, двухсайтного иммуноферментного анализа (сэндвич-ELISA). Для этого в лунки микротитровальных планшетов вносили растворы антител в концентрации 5 мкг/мл в 0,1 M карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,5 (буфер 1), по 100 мкл в лунку. После инкубации в течение ночи при температуре 4°C и ополаскивания планшетов, свободные сайты полистирола блокировали 10 % раствором стандартной цыплячьей сыворотки («Sigma») в трис-HCl солевом буфере с твином: 20 mM трис-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % твин 20, pH 7,4 (ТСБ-т) (буфер 2), который вносили в количестве 150 мкл в лунку. С этим раствором планшеты

инкубировали 1 ч при 4°C и вновь ополаскивали, после чего в лунки планшета вносили по 100 мкл исследуемого экстракта. Экстракт мышечных белков готовили, гомогенизируя 5 г мясного фарша или смесь фаршей в 20 мл физиологического раствора. Для лучшего экстрагирования гомогенат оставляли на 1 час при комнатной температуре, после чего фильтровали через бумажный фильтр, центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин и разводили 1: 1 с ТБС-т. Планшеты с экстрактом инкубировали 2 ч при 37°C. Затем в лунки наносили ТБС-т (буфер 2), конъюгат истощенных антител с пероксидазой хрена в разведении 1: 200 и выдерживали 2 ч при 37°C. Конъюгат кроличьих антител с пероксидазой хрена с использованием периодата натрия готовили по методу Nakane, Kawaoi (1974) в модификации Wilson, Nakane (1978). Образовавшиеся комплексы меченных ферментом антител с антигенами детектировали по цветным продуктам реакции пероксидазы с тетраметилбензидином (ТМБ) из расчета 10 мг субстрата на плашку в 10 мл 0,1 М натрий-цитратного буфера pH 4,0, по 100 мкл в лунку. Инкубация с субстратом длилась 10-15 мин, после чего реакцию останавливали, внося в каждую лунку по 50 мкл 1М раствора H₂SO₄. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 450 нм на сканирующем фотометре «Униплан 2000».

Результаты и обсуждение

Для исследования готовили следующие смеси фаршей: куриный с говядиной, козий с говядиной, свиной с говядиной и куриный со свининой. Количество говядины и свинины в каждой из смесей составляло 10%, 20%, 40%, 60% и 80%. В качестве отрицательных контролей использовали куриный, козий, свиной и говяжий фарши, в качестве положительных – говяжий и свиной фарши.

Нами было выявлено, как это видно на представленных рисунках 1 и 2, что фоновая активность находилась в пределах 0,1 Е оптической плотности, что можно признать вполне приемлемой величиной. Для нахождения величины фоновой активности в одни из лунок планшета не вносили первичные антитела, а в другие – не вносили экстракты мышечной ткани. Значения оптической плотности отрицательных контролей (лунки с экстрактами куриного, козьего и говяжьего фаршей) также находились на уровне 0,1. В специально приготовленных пробах, с добавлением к основному фаршу минимального количества фарша других видов животных (10% по сырому весу), вызывало значимое, уверенно фиксируемое, повышение оптической плотности.



Полученная и отраженная на рисунках информация свидетельствует о том, что на данном этапе разрабатываемая тест-система обладает вполне значимыми количественными характеристиками чувствительности и специфичности. Прослеживается достаточно строгая линейная зависимость между величинами оптической плотности и количеством добавленных в анализируемую смесь мышечных белков крупного рогатого скота и свиней.

Заключение

Разработана тест-система иммуноферментного анализа мышечных белков крупного рогатого скота и свиней. Метод позволяет определять количество говядины в курином и козьем фарше и количество свинины в курином и говяжьем фарше при их добавлении в размере от 10 % и выше, по массе сырой ткани.

В дальнейшей работе планируется продолжить совершенствование метода с целью повышения его точности, чувствительности, специфичности и воспроизводимости. Это должно позволить надежно определять в смеси различных мясопродуктов наличие свинины и говядины в количест-

ве 1 % и ниже, из расчета на вес сырой мышечной ткани. На основе полученных антигенов и антител планируется разработать тест-системы безинструментального экспресс-анализа, пригодного для использования во вне-лабораторных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Engvall E., Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971, 8: 871-874.
2. Van Weemen B.K., Schuurs A.H.W.M. Immunoassay using antigen-enzyme conjugate. *FEBS Letters*. 1971, 15: 232-236.
3. Yalow R.S. & Berson S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*, 1959, 184: 1648-1649.
4. Кэтти Д. и Райкундалия Ч. Получение поликлональных антител и контроль их качества. В кн.: Антитела. Методы. Под ред. Д.Кэтти. М., 1991: 33-115.
5. Coons A.H. & Kaplan M.H. *Journal of Experimental Medicine*. 1950, 91: 1
6. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1974, 22: 1084-1091.
7. Wilson M.B., Nakane P. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: *Immunofluorescence and Related Staining Techniques* (Knapp et al., eds.), North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 1978: 215.
8. Езерская Е.Я., Галочкин В.А. Идентификация видоспецифичных мышечных белков сельскохозяйственных животных и птицы. *Сельхоз. биология*. 1999, 6: 3-9.

ВЛИЯНИЕ ТАНИНОВ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ТКАНЕВОГО ДЫХАНИЯ СУТОЧНЫХ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ

С.Ю. Гулюшин¹, Т.Н. Ленкова²
Лаборатория энергетического питания¹
ВНИТИ Птицеводства²

Комбикорма и отдельные ингредиенты, содержащие конденсированные полифенольные вещества, способны оказывать многофакторный угнетающий эффект на растущий организм птицы. В эксперименте in vitro изучалось влияние танинов на интенсивность тканевого дыхания жизненно важных органов суточных цыплят. Результаты показали, что ткани головного мозга, слизистой кишечника и гепатоциты весьма подвержены их дезорганизующему влиянию. Возрастающие дозировки танина вызывают компенсаторную перестройку метаболизма на уровне кле-

точных ферментов; декомпенсация сопровождается физиологической гибелью клеток. Летальными дозами, снижающими интенсивность обменных процессов на 50 %, для указанных тканей соответственно являются: 13,35; 18,31 и 20,77 мг%.

Введение

Танины – конденсированные дубильные вещества, являющиеся производными биофлаваноидов, в практике кормления идентифицируются как антипитательные вещества или природные антифиданты (Методические рекомендации..., 1999). Танины, обладая «вяжущей» способностью, отнимают воду с поверхности клеток и тканей, вызывают коагуляцию белков слизистой оболочки кишечника, а также ферментов, имеющих белковую природу (Ермаков, 1987; Виноградов и др., 1998). В пищеварительном тракте они способны связаться с протеинами и некоторыми микроэлементами, образуя с ними трудногидролизуемые комплексы (Активность ингибиторов..., 1986; Ермаков, 1987). В результате этого существенно ухудшается доступность для организма как структурного, так и энергетического материала (Натрошвили, 1981).

Нашими предыдущими исследованиями установлено, что включение зерна чумизы сортов «Стачуми-3» и «Стрела» селекции Ставропольского НИИСХ и ВНИИ зернобобовых и крупяных культур (г. Орел) в сбалансированные комбикорма, сопровождается неоднозначными результатами выращивания бройлеров. По всей видимости, различия в химическом составе зерна обоих сортов оказывают непосредственное влияние на процессы жизнедеятельности. Однако, если при включении чумизы в полнорационные комбикорма различия в энергии, сыром протеине, жире, сырой клетчатке, углеводистых компонентах, аминок- и жирнокислотном составе в некоторой степени нивелируются общей сбалансированностью рационов, то содержание танинов (как фактора питания) возрастает пропорционально увеличению дозировки ингредиента в комбикорме.

Исследования показали, что содержание танинов в чумизе сорта «Стачуми-3» составляет $0,27 \pm 0,05$ %, в «Стреле» – $0,87 \pm 0,04$ %, что достоверно выше ($P \geq 0,95$), чем в первом сорте в 3,2 раза. Поэтому, если оптимальным уровнем включения «Стачуми-3» без ферментных препаратов явилось 30-35 %, то «Стрелы» – всего лишь 10-15 % от массы комбикорма. Дозировки обоих сортов свыше указанных значений вызывают выраженную депрессию роста птицы, сопровождающуюся ухудшением использования питательных веществ кормосмесей, угнетением активности пищеварительных ферментов дуоденум. Аналогичного мнения придержи-

ваются и другие исследователи (Натрошвили, 1981; Методические рекомендации..., 1999).

Однако влияние танинов на этом не ограничивается. Данные экспериментов показали, что танины из потребленного комбикорма способны проникать через стенку желудочно-кишечного тракта в кровь. Биохимическое определение танинов в сыворотке крови бройлеров при включении чумизы в рационы птицы от 0 до 40 % составило от почти 0,0 до $4,38 \pm 0,15$ мг%, в контрастных группах соответственно. Несомненно, наличие танинов в крови бройлеров депрессирует процессы метаболизма «в тылу» организма: на клеточном и субклеточном уровнях; в разных тканях – в разной степени (Garcia, Maier, 1995; Bagliacca et al., 1996).

Теоретической предпосылкой снижения продуктивности птицы является изменение ферментативного статуса. Известно, что ферменты играют важную роль в обменных процессах, обеспечивая адекватное взаимодействие между биологическим объектом и окружающей средой (Дмитров и др., 1986; Методы биохимического анализа..., 1997). В свою очередь танины, проникая внутрь, ингибируют большинство из них, вызывая нарушения обмена веществ и энергии, обуславливают структурные и функциональные повреждения, т.е. вызывают патологические изменения жизненно важных органов и систем (Elkin, Rogler, 1990; Diao et al., 1999). Изменяется «правило соответствия» ферментных взаимоотношений организма химическим структурам пищи. Поэтому при скармливании птице зерна, содержащего повышенное количество конденсированных полифенольных антифидантов, наблюдается угнетение как основных клеточных ферментов, так и связанных с ними процессов жизнедеятельности организма (Дмитров и др., 1986; Douglas et al., 1993; Garcia, Maier, 1995; Bagliacca et al., 1996).

Представление о том, что в основе жизни лежит сложноорганизованная, сопряженная деятельность многих сотен и тысяч биокаталитических систем, направленная на ассимиляцию и превращение питательных веществ, естественно, заставляет рассматривать патологические процессы, с определенной точки зрения, как проявление дезорганизации этой деятельности (Дмитров и др., 1986; Diao et al., 1999). С этой точки зрения, токсиколого-гигиеническая характеристика танинов, как фактора вероятной опасности в производственных условиях, является чрезвычайно важным этапом в увеличении продуктивности сельскохозяйственной птицы (Дмитров и др., 1986; Активность ингибиторов..., 1986; Методические рекомендации..., 1999). Детальное изучение влияния танинов на организм птицы позволит разработать гигиенические нормативы и биологически обоснованные регламенты использования соответствующих кормов в пти-

цеводстве (просо, сорго, пайза, чумиза и др.), учитывая наиболее характерные нарушения метаболизма в причинно-следственном аспекте.

Известно, что тканевый энергетический обмен – чрезвычайно сложный биологический процесс, характеризующий уровень жизнедеятельности всех органов и систем. Он связан с окислением субстрата и превращением потенциальной энергии химических связей в доступные для организма формы (Методические указания..., 1986; Методы биохимического анализа..., 1997) . Это в значительной степени обеспечивает энергетическую поддержку выполнения птицей тех или иных хозяйственно-полезных функций.

Тканевое дыхание, при использовании наиболее рациональной цепи окисления, включает в себя участие большого числа ферментов и ферментных систем (энзимы цикла Кребса, цитохромы дыхательной цепи и т.д.), функционирующих синхронно. Поэтому любое нарушение и ингибирование строгой ферментативной последовательности превращения субстрата (на каком бы то ни было этапе) неизбежно отразится на общей энергетике тканей, а также на количестве потребленного кислорода и выделенного углекислого газа (Методические указания..., 1986). С этой точки зрения, динамика изменения тканевого дыхания может быть наиболее эффективной биологической моделью по определению негативного влияния танинов на процессы жизнедеятельности и оценки его степени действия (Натрошвили, 1981; Дмитров и др., 1986; Farrell et al., 1999).

Однако в литературе недостаточно данных о влиянии танинов на метаболизм тканей птицы, обуславливающих проявление того или иного нарушения обмена веществ. Поэтому, выдвигая предположение о всеобъемлющем влиянии конденсированных полифенолов, мы поставили задачу изучить влияние различных дозировок танина на интенсивность процессов жизнедеятельности различных тканей, в том числе: головного мозга (регулирующая функция), слизистой дуоденум (пищеварительная функция), печени (общая обменная и детоксицирующая функции) цыплят-бройлеров, а также определить летальную дозу (ЛД₅₀) танина, снижающую интенсивность обменных процессов в тканях на 50 %.

Материалы и методы

Опыты проводили в лаборатории энергетического питания животных ВНИИФБиП. Уровень тканевого дыхания (*in vitro*) изучали манометрическим методом в аппарате Варбурга (Методические указания..., 1986).

У суточных цыплят-бройлеров кросса «Конкурент-2» (ЭПХ ВНИТИП) извлекали соответствующие органы, не позднее 5-10 мин готовили жесткие гомогенаты тканей (растирали в ступке с песком). Гомогенаты количественно (100-150 мг) переносили в сосудики с питательной средой, которые помещали в ванну аппарата Варбурга и инкубировали при температуре 38,0 °С. Газовая среда – воздух. Использование кислорода и выделение углекислоты фиксировали по истечении четверти часа.

Питательные среды состояли из 1 мл раствора Кребса-Рингера-фосфата [КРФ] (поддержание буферности), 1 мл свежей сыворотки крови кур-несушек (источник питательных веществ и гуморальных факторов регуляции). В опытные группы добавляли 1 мл раствора фармацевтического танина (галло-дубильная кислота пирогаллоловой группы), приготовленного на растворе КРФ, чтобы доза действующего вещества на 1 мл среды соответствовала концентрации, указанной в схеме опыта. Контролировали изотоничность и pH приготовленных растворов.

Результаты и обсуждение

При анализе результатов газоэнергетического обмена (табл. 1) обращает на себя внимание определенная интенсивность обменных процессов в нервной ткани. Так, по сравнению с печенью и слизистой кишечника, поглощение кислорода и выделение углекислого газа тканью головного мозга было в 2,2-2,3 раза больше. Известно, что нервные клетки – весьма чувствительны к какому бы то ни было воздействию, поэтому нарастание в инкубационной среде ингибирующего фактора достоверно угнетало их жизнедеятельность на 34,2; 73,5; 77,6; 91,5 97,0 и 99,5 % соответственно. Наряду с уменьшением поглощения кислорода фиксировалось достоверно отчетливое уменьшение выделения углекислого газа на 31,5; 73,0; 76,9; 90,9; 96,3 и 99,1 % по сравнению с контрольной группой, соответственно.

Необходимо отметить, что при относительно низких концентрациях (10-75 мг%) танина, дыхательный коэффициент ткани оставался близким к единице, в то время как высокие дозы (100-150 мг%) вызывали определенные приспособительные реакции, увеличивающие дыхательный коэффициент до 1,23-1,59. В целом же, ткань головного мозга птицы оказалась чрезвычайно чувствительной к воздействию танина. Так при ее инкубировании в среде, содержащей 150 мг% танина, интенсивность энергетического обмена снижалась более чем в 175 раз. После 10-15 минут нахождения в этой инкубационной среде она не проявляла признаков жизни, тогда как в контрольной группе клетки дышали еще спустя 25-35 минут.

Наиболее интересные изменения, на которых мы хотели бы заострить внимание, происходили в клетках печеночной паренхимы. Несмотря на то, что аналогичные уровни танина в среде вызвали угнетение поглощения кислорода на 36,4; 57,6; 72,7; 86,2; 89,0 и 93,7 % по сравнению с контрольной группой, выделение углекислоты уменьшалось лишь на 13,6; 20,5; 31,3; 52,0; 71,5 и 82,9 %. При этом дыхательный коэффициент ткани имел тенденцию к резкому возрастанию, показывая, что выброс углекислоты тканью достоверно превышает потребление кислорода в 1,6-2,3 раза с увеличением концентрации танина в среде.

Известно, что печень обладает детоксицирующей функцией (Дмитров и др., 1986). В свою очередь танины, являясь восстановителями, легко окисляются (в частности, пероксидазой и перекисью водорода, глутатионом, перманганатом калия и т.д.) до CO_2 и H_2O (Активность ингибиторов..., 1986; Ермаков, 1987). До некоторой степени объяснение усиленному выделению углекислого газа можно найти в увеличивающемся относительном содержании танина на единицу навески. Оно может быть вполне закономерным, хотя прямых доказательств такому предположению нет.

Таблица 1. Тканевый энергетический обмен при разных уровнях танина в инкубационной среде [n = 4]

Показатели	Содержание танина в среде, мг%						
	0 (К)	10	20	50	75	100	150
Ткань головного мозга цыплят							
Потребление O ₂ тканью, (мкл: г×час)	701,9 ±149,5	461,9 ±67,0	186,0* ±53,9	157,2* ±10,1	59,9* ±5,4	21,1* ±5,5	3,8** ±0,6
Выделение CO ₂ тканью, (мкл: г×час)	695,0 ±151,8	476,2 ±91,6	187,9* ±59,1	160,4* ±56,4	63,7* ±24,3	26,0** ±4,0	6,1** ±1,1
Дыхательный коэффициент (CO ₂ : O ₂)	0,98	1,03	1,01	1,02	1,06	1,23	1,59
Калорический эквивалент дыхания, (кДж: кг×час)	1473,4	981,2	393,2	333,1	128,1	46,8	8,9
Слизистая duodenum & <i>Jejunum</i>							
Потребление O ₂ тканью, (мкл: г×час)	301,7 ±31,7	206,1 ±30,3	144,5* ±48,2	55,2* ±21,3	55,0* ±15,4	25,9* ±1,4	3,5** ±2,8
Выделение CO ₂ тканью, (мкл: г×час)	240,7 ±47,8	203,4 ±99,5	148,5 ±65,5	82,8 ±14,8	76,4 ±36,4	36,7* ±11,6	6,9** ±9,4
Дыхательный коэффициент (CO ₂ : O ₂)	0,80	0,99	1,03	1,49	1,39	1,42	1,97
Калорический эквивалент дыхания, (кДж: кг×час)	605,4	433,7	307,0	128,0	125,6	59,4	8,3
Паренхиматозная ткань печени							
Потребление O ₂ тканью, (мкл: г×час)	314,9 ±42,2	200,2 ±33,4	133,5 ±32,5	86,0* ±14,0	43,5* ±10,4	34,6* ±3,7	19,8* ±4,2
Выделение CO ₂ тканью, (мкл: г×час)	265,4 ±62,3	229,2 ±99,3	211,1 ±39,9	182,3 ±29,1	127,4 ±55,8	75,7* ±10,9	45,3* ±16,4
Дыхательный коэффициент (CO ₂ : O ₂)	0,84	1,15	1,58	2,12	2,93	2,18	2,29
Калорический эквивалент дыхания, (кДж: кг×час)	638,4	436,9	313,0	202,4	72,0	80,8	25,3
Окисление резазурина печенью, мг: (кг×час)	362,0 ±17,7	271,9* ±12,2	289,4* ±6,6	259,6* ±16,2	192,2** ±12,6	91,5*** ±6,8	48,2*** ±4,7

* P ≥ 0,95

Экспериментальные данные убедительно доказывают, что танины не сразу «убивают» клетки печени (как головного мозга), а вызывают адаптационную перестройку метаболизма гепатоцитов (эффект Пастера), что не характерно для нейронов. Жизнедеятельность клетки при высоких концентрациях танина ясно подтверждается продолжающимся декарбоксилированием субстрата и отчасти инактивацией танина. Однако танины депрессируют абсорбцию кислорода тканью, тип дыхания клеток смещается в анаэробную фазу, в результате чего в энергетике клетки доминирует гликолиз.

В случае, когда роль конечного акцептора протонов в интактном организме выполняет не кислород, становятся очевидными механизмы накопления в сыворотке крови птицы, выращенной на комбикормах с чумизой, недоокисленных метаболитов (пируват, лактат) и «запуска» перекисного окисления – как механизм компенсации дефицита доступной энергии. Из данных таблицы видно, что уже при концентрации танина свыше 50 мг% анаэробное дыхание гепатоцитов не обеспечивает и трети энергии на поддержание клеток, тем не менее, изменение газовых величин отмечается в течение 1,5-2,0 часов, интенсивность дыхания в контрастных средах уменьшается в 25 раз.

Полученные данные по интенсивности дыхания были дополнены дублирующим экспериментом по интенсивности окисления резазурина гепатоцитами. Являясь редокс-индикатором окислительно-восстановительных процессов, растворенный в среде резазурина также является акцептором электронов дыхательной цепи и, изменением окраски, суммарно отражает интенсивность как кислородного, так и «внутримолекулярного» (или «бескислородного») дыхания (75,1; 79,9; 71,7; 53,1; 25,3 и 13,3 %).

Данные показывают, что при концентрации танина 10 мг%, интенсивность окисления резазурина совпадает с интенсивностью потребления кислорода и аэробным калорическим эффектом. Однако при возрастающих концентрациях (20-150 мг%), кривая окисления резазурина в опыте совпадает с динамикой выделения углекислоты – оба показателя существенно превышают потребление кислорода. Таким образом, становится очевидно, что концентрации танинов 10 мг% еще недостаточно для масштабного запуска гликолиза, тем не менее, намечаемая тенденция анаэробнозиса имеет высокую достоверную степень вероятности. При концентрации 20 мг% и выше отчетливо фиксируется перестройка метаболизма клеток, что особенно наглядно при визуальном сопоставлении кривых.

Согласно результатам исследования, реактивность слизистой кишечника к наличию танинов занимает промежуточное положение между клетками печени и головного мозга цыплят (68,3;47,9;18,3;18,2;8,6 и 1,2 %). Указанные нарушения метаболизма также применимы и к ней. Необходимо отметить, что нарушение газо-

энергетических показателей слизистой (в 70-80 раз) непосредственным образом сказывается на угнетении секреторно-синтетической функции пищеварительных ферментов дуоденум, что также проливает свет на причинно-следственные аспекты ухудшения использования питательных веществ птицей при обнаружении танинов в кормосмесях.

Чувствительность организма и тканей птицы к танинам тем выше, чем меньше его количество (доза) вызывает расстройство жизнедеятельности организма. Дополненные регрессионными вычислениями данные показывают, что дозой, снижающей интенсивность метаболизма на 50 %, для нервной ткани является величина 13,35 мг%, слизистой кишечника – 18,31 мг%, печени – 20,77 мг%. Таким образом, все исследуемые ткани оказались в значительной степени подвержены влиянию дубильных веществ: клетки нервной ткани головного мозга и слизистой кишечника – в большей степени, чем клетки печени.

Заключение

На основании имеющихся данных считаем возможным сделать заключение, что танины, проникая в организм птицы, способны ингибировать ферментные комплексы клеток, вызывая серьезные нарушения обмена веществ и энергии. Ткани цыплят, за исключением печени, не обладают выраженными адаптационными возможностями, поэтому дефицит полезной энергии у них вызывает ускоренную физиологическую гибель клеток.

Имеются все основания присоединиться к мнению других исследователей, что скормливание кормосмесей, содержащих дубильные вещества свыше 0,15-0,2 %, физиологически не обосновано, ведет к патологическим сдвигам метаболизма, наносит вред здоровью птицы, не позволяет получить нормальную по количеству и качеству продукцию. В случае использования в комбикормах для птицы ингредиентов, содержащих повышенный уровень танинов, большое внимание необходимо уделять предварительной подготовке кормов к скормливанию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов В.И., Мухин Е.А., Фролов С.Ф. Ветеринарная фармакология с рецептурой. М.: Колос. 1998: 360 с.
2. Дмитриев С., Джуров А., Антонов С. Диагностика отравлений животных. М.: Агропромиздат. 1986: 245 с.
3. Ермаков А.И. Танины. В кн.: Методы биохимических исследований растений – 1987: 420 с.
4. Методические рекомендации по кормлению сельскохозяйственной птицы. Под общ. редакцией В.И. Фисинина. ВНИТИП - Сергиев Посад - 1999.

5. Методы биохимического анализа (справочное пособие) под общ. ред. Кальницкого Б.Д. ВНИИФБиП. Боровск. 1997: 352 с.
6. Натрошвили М.К. Использование зерна сорго в кормлении бройлеров. Дис. на соискание учен. степ. канд. с.-х. наук. Загорск. 1981: 139 с.
7. Вахопский Э.К., Жукова М.П. Чумиза сорта «Стачуми-3». Селекция и семеноводство. 1998. 2: 34 с.
8. Активность ингибиторов протеаз и гемагглютинины в сем люпина. Сб. биохимических исследований культурных растений. Сб. науч. труд. ВАСХНИЛ-ВИР. 1986. 107: 23 с.
9. Методические указания: Изучение обменной энергии и энергетического питания у сельскохозяйственных животных. Под ред. Надальнака Е.А., Агафонова В.И., Киселева А.Ф. и др. ВАСХНИЛ-ВНИИФБиП. Боровск. 1986: 55 с.
10. Танины. Сб. научных трудов Химические вещества зерновых культур ВИР. 1971. 77: 57-60.
11. Bagliacca M., Paci G., Marzoni M., Biagi G., Avanzi C. Effect of sorghum tannin on metabolic profile of Muscovy and common ducks (*Cairina moschata* L. and *Anas platyrhynchos* L.). / Annali della Facolta di Medicina Veterinaria di Pisa. 1996, 49: 87-94.
12. Diao QiYu, Qi Guang Hai, Diao Q.Y., Qi G.H., Brooker J.D. Tannins in livestock feeds in China. Tannins in livestock and human nutrition. Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May 2 June 1999: 66-70. (Australian Center for International Agricultural Research).
13. Douglas J.H., Sullivan T.W., Gonzalez N.J., Beck M.M. Differential ages response of turkeys to protein and sorghum tannin levels. Poultry Sci., 1993, 72, 10: 1944-1951.
14. Elkin R.G., Rogler J.C. Comparative effect of dietary tannin in ducks, chicks and rats (Metabolism and Nutrition). / Poultry Sci., 1990, 69, 10: 1685-1693.
15. Farrell D.J., Perez Maldonado R.A., Brooker J.D. Tannins in feedstuffs used in the diets of pigs and poultry in Australia. Tannins in livestock and human nutrition. Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May 2 June 1999: 24-29. (Australian Centre for International Agricultural Research)
16. Garcia D.C., Maier J.C. Reducao do teor de tanino no sorgo mediante moagem e armazenamento dos graos e sua acao sobre o desempenho de pintos na fase inicial. Rev. Soc. Brasil. Zootecn., 1995, 24, 1: 70-77.
17. Jimenez Ramsey L.M., Rogler J.C., Housley T.L., Butler L.G., Elkin R.G. Absorption and distribution of ¹⁴C-labeled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. J. Agr. Food Chem., 1994, 42, 4: 963-967.
18. Pour Reza J., Edriss M.A. Effects of dietary sorghum of different tannin concentrations and tallow supplementation on the performance of broiler chicks. Brit. Poultry Sci., 1997, 38, 5: 512-517.
19. Vernon B.G., Caygill J.C., Mueller H. I. Tannins: implications for non ruminants. Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding. 1999: 41-49. (Nottingham University Press, Nottingham, UK).

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ВАККАТ-КИСЛОРОДНЫМ МЕТОДОМ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТАНИНОВ

С.Ю. Гулюшин¹, Д.Н. Морозов²
Лаборатория энергетического питания¹
Лаборатория пищеварения²

В статье приводится новая методика определения ваккат-кислородного числа органического вещества с использованием перманганата калия (в качестве окислителя) и ФЭКа, позволяющая определить изменения энергоемкости корма, кормовых масс ЖКТ и помета и на этой основе оценить функцию пищеварительного аппарата птицы.

Указанным методом была исследована функция ЖКТ бройлеров, получавших комбикорма с различным (0,3 и 0,6 %) содержанием танинов, что позволило проследить и оценить отклонения в пищеварении при разных уровнях антифиданта. Исследование показало, что возрастающие уровни танина угнетают адсорбционную активность пищеварительного тракта. Изменения в использовании питательных веществ комбикормов наиболее выражены в тонком и толстом кишечнике птицы. В эксперименте, проведенном параллельно с балансовым опытом, обращается внимание на причины угнетения использования энергии и компенсаторные изменения метаболизма птицы при чрезмерных дозировках антинуutriента. Результаты эксперимента свидетельствуют о простоте и точности данного метода исследования.

Введение

От эффективности функционирования ЖКТ зависит здоровье и продуктивность животных, поскольку именно с кормом птица получает необходимую энергию, питательные и биологически активные вещества, обеспечивающие ее нормальную жизнедеятельность. В последнее время в практике кормления животных и птицы все чаще используются новые кормовые средства и биологически активные добавки, интенсивно внедряются различные способы предварительной подготовки кормов (Методические рекомендации..., 1999). В этой связи возникает необходимость исследования функции ЖКТ, чтобы установить и объективно оценить влияние того или иного фактора питания. Для такой оценки требуется совершенствование или разработка новых комплексных методов функциональной диагностики органов пищеварения (Методы биохим. анализа, 1997).

Для изучения процессов пищеварения у сельскохозяйственной птицы проводят острые и хронические исследования на всем желудоч-

но-кишечном тракте и на его изолированных участках, с целью изучения моторики кишечника, интенсивности секреции и активности ферментов пищеварительного сока; изучение химического состава его содержимого для определения коэффициентов переваримости питательных веществ и энергии по результатам балансовых опытов. Часто для косвенной характеристики функционирования проводят анатомо-морфологические и гистологические исследования (Черниговский, Соловьев, 1974).

Однако перечисленные методы не позволяют установить динамику процессов, происходящих в ЖКТ, определить характер этих изменений, количественно оценить и проследить динамику компенсаторных механизмов на низлежащих участках. Исследования с применением указанных методов не позволяют конкретизировать, на каком именно участке пищеварительного тракта (при явной патологии) изменяется всасывание питательных веществ и энергии.

Известно, что процесс пищеварения в ЖКТ неразрывно связан с сложным гидролитическим расщеплением биополимеров и интенсивным всасыванием продуктов ферментализации. В результате этого, по мере прохождения по кишечной трубке, постепенно уменьшается доступная энергия химических связей корма (Черниговский, Соловьев, 1974). Изменения энергоемкости кормовых масс, как заключительный этап пищеварения, положены нами в основу оценки функции пищеварительного аппарата.

Принцип метода основан на определении восстановительного потенциала химуса, что характеризует изменяющуюся его энергоемкость (косвенно – уменьшающееся содержание питательных веществ) по мере продвижения по пищеварительному тракту, а значит – интенсивность их всасывания и изменение функции последнего. Метод позволяет поэтапно определить всасывание совокупности элементов питания, формирующих общую энергоемкость корма, поскольку изменение соотношения этих веществ непосредственно отражается на калорийности кормовых масс желудочно-кишечного тракта.

Дифференцированное определение данного показателя на всем протяжении кишечной трубки позволяет выяснить, как изменяется восстановительный потенциал корма в процессе переваривания, а сопоставляя смежные значения, можно оценить, где интенсивнее секретятся (адсорбируются) вещества из или в стенку пищеварительного тракта. Исследование целесообразно проводить параллельно с балансовыми опытами.

Материалы и методы

В основу метода положена модифицированная методика оксидиметрического анализа. Определение ваккат-кислородного числа кор-

ма, химуса и помета ведется с помощью KMnO_4 . Количество (мл) молекулярного кислорода, пошедшего на окисление 1 г органического вещества, определяется расчетным путем.

Метод фатальный. Все образцы содержимого ЖКТ берутся для исследования после убоя птицы. Для этого у убитой птицы полностью извлекают полые органы пищеварения (зоб, желудки, тонкий и толстый кишечник). Из каждого органа отбирают среднюю пробу содержимого.

Наибольшие изменения корм претерпевает в кишечнике, поэтому для большей точности кишечную трубку делят на несколько равных частей (7-15), каждую по возрастанию выражают относительно длины кишечника в процентах или анатомически. Образцы химуса берут из каждой его части и готовят для определения ваккат-кислородного числа.

Для анализа из фиксаналя готовится 0,003 н рабочий раствор перманганата калия, содержащий серную кислоту (0,5 н). Перед использованием раствор выдерживают в течение суток в темном месте. При необходимости переустанавливают его титр.

С химусом и пометом работают без предварительного измельчения. Образцы корма и содержимого зоба или сухой помет, не подвергшиеся механическому разупрочнению, предварительно (в пируэтке) мелко размалывают в муку. Взятые образцы корма, помета (30-40 мг) или химуса (180-200 мг), содержащие, как правило, труднорастворимые и волокнистые компоненты, подвергают кислотному гидролизу. Для этого в колбе на 300 мл навеску разводят в 200 мл 1 н серной кислоты и выдерживают при температуре 80-100 °С в течение 2-2,5 ч, затем охлаждают. Полученный гидролизат доводят дистиллированной водой до 300 мл (разведение в 10.000 раз – для корма и в 2.000 раз – для химуса). Раствор охлаждают и готовят для фотокалориметрии.

Для определения восстановительного потенциала:

- В 1-ую контрольную пробирку наливают 5 мл рабочего раствора + 1 мл дистиллированной воды и снимают показатели светопропускания – первая контрольная экстинция ($D_{\text{контроль 1}}$).
- Во 2-ую контрольную пробирку наливают 1 мл исследуемого раствора + 5 мл дистиллированной воды – вторая контрольная экстинция ($D_{\text{контроль 2}}$). Это необходимо делать, если исследуемый раствор имеет определенную окраску, изменяющуюся в ходе анализа.
- Опытные пробирки заполняют 5 мл перманганата калия и 1 мл исследуемого раствора, показания оптической плотности снимают после продолжительной выдержки (через 48-72 ч при комнатной температуре), которая необходима для полного окисления органического вещества – опытная экстинция ($D_{\text{опытная}}$).

Измерения проводят в кюветах длиной 10 мм, против дистиллированной воды или холостой пробы в режиме зеленого светофильтра (540 нм).

Восстановительный эквивалент рассчитывают по формуле:

$$C_2 = C_1 - C_1 \times ((D_{\text{оп}} - D_{\text{конт2}})/D_{\text{конт1}}),$$

где C_1 – количество окислительных грамм-эквивалентов перманганата калия, содержащихся в исходном растворе (0,005 л $\times$ 0,003 н = 0,000015 экв.);

$D_{\text{к1}}$; $D_{\text{к2}}$, $D_{\text{оп}}$ – экстинция контрольных и опытных проб образца.

Необходимо отметить, что между оптической плотностью раствора и концентрацией перманганата калия имеется прямолинейная зависимость до концентрации до $\approx 0,0024$ экв/л, что соответствует экстинции раствора – 1,000. Работа с растворами, оптическая плотность которых выше указанного значения, не подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера и дает ошибочные результаты.

Поскольку в пробирку добавляют 5 мл 0,003 н раствора перманганата калия и 1 мл исследуемого раствора или дистиллированной воды, то нормальность исходного раствора будет находиться в пределах 0,0025 экв/л.

Параллельно с этим определяют сухое вещество химуса, на который в дальнейшем делается перерасчет. Для этого небольшую часть химуса (200-500 мг) взвешивают на аналитических весах до и после высушивания. Расчет ведут по общепринятой методике разности масс.

За результат анализа берется среднее между 2-3 параллельными определениями, расхождения между которыми не должны превышать 0,5 % для $P \geq 0,95$. Результаты исследований целесообразно выражать в миллилитрах кислорода (н.у.), которое необходимо для окисления 1 г сухого органического вещества.

Пример расчета. Исследовали образец химуса, для этого 150 мг растворили в 300 мл и провели кислотный гидролиз. Фотометрически получили следующие результаты: $D_{\text{к1}} = 0,950$; $D_{\text{к2}} = 0,01$; $D_{\text{оп}} = 0,36$, тогда $C_2 = 0,0000238 - 0,0000238 \times ((0,36 - 0,01) : 0,95) = 0,000015$. Таким образом, 1 мл исследуемого раствора содержит 0,000015 восстановительный эквивалент. Поскольку было взято разведение (по массе) 1:2000, то 1 г химуса (без разведения) сопоставим с 0,03 экв. по восстановительному потенциалу. Учитывая содержание сухого вещества (20 %), рассчитываем восстановительный эквивалент 1 г сухого вещества – 0,15 экв. (0,03 $\times$ 100:20). Затем делается перерасчет на молекулярный кислород.

Так как 0,15 экв. восстановителя должно окислить ровно 0,15 экв. окислителя, рассчитаем объем O_2 , содержащий указанный окислительный эквивалент. Из таблицы Д.И. Менделеева имеем, что 8 г кислорода содержит 1 эквивалент (32:4). Тогда 8 г/экв. $\times$ 0,15 экв. = 1,2 г кислорода, которое необходимо для окисления 1 г сухого вещества химуса. Переведем массу в объем (н.у.): 1,2 г $\times$ 22400 мл/моль: 32,0 г/моль = 840 мл O_2 , которое необходимо для окисления 1 г сухого вещества химуса или 0,15 экв. $\times$ 5600 мл/экв = 840 мл O_2 . В результате наших исследований имеем, что ваккат-кислородное число 1 г сухого вещества химуса составляет 840 мл; соответственно 100 г сухого вещества окислит 84,0 л O_2

Для справки: На окисление 1 г глюкозы требуется 747 мл O₂, крахмала - 829 мл O₂, жира (смешанные растительные масла, жиры, триглицериды) – в среднем 2021 мл O₂, протеина (смешанный) – в среднем 966 мл O₂.
1 л 0,001 н (0,001 экв.) раствора перманганата калия эквивалентен по окислительной способности 5,6 мл O₂.

С использованием предлагаемой методики было изучено влияние танинов на пищеварение бройлеров, путем определения ваккат-кислородного числа содержимого разных участков желудочно-кишечного тракта.

В современных гипотезах, объясняющих причины угнетения танинами переваримости питательных веществ, наряду с другими факторами, основной точкой приложения служат их физико-химические свойства. Известно, что конденсированные дубильные вещества, содержащиеся в некоторых зерновых, могут оказывать ингибирующее влияние на активность пищеварительных ферментов дуоденум, конденсируясь с апоферментом энзимов. Образующиеся комплексные соединения с некоторыми питательными веществами эпатируют уменьшение их доступности для организма. Кроме того, метаболически угнетается секреторная функция слизистой кишечника. В практике кормления танины рассматриваются как антипитательные факторы. Однако в литературе недостаточно сведений о конкретном месте их негативного приложения, и на сколько данное вещество угнетает в целом использование энергии при наличии его в рационах птицы (Беликов, 1996; Виноградов и др., 1998; Гулюшкин, Ленкова, 2002; Дмитров и др., 1986; Ермаков, 1987; Bagliacca et al., 1966; Doyglas et al., 1993; Eltin, Rogler, 1990; Farrell et al., 1999; Garcia, Maier, 1995).

Для этого в условиях вивария ВНИТИП были сформированы 3 группы бройлеров кросса «Конкурент-2» в возрасте 49 дней по 3 головы в каждой. Проводились балансовые опыты. Каждой группе скормливался полнорационный сбалансированный комбикорм ПК-6, приготовленный согласно рекомендациям ВНИИТИП (1999) по кормлению птицы. В комбикорм опытных групп был добавлен фармацевтический танин (полифенольное вещество – галло-дубильная кислота, ч.в. – 99,6 %) в априорно завышенном количестве: 0,3 и 0,6 % по массе. Анатомические и биохимические исследования проведены во ВНИИФБиП. Определение ваккат-кислородного числа образцов проводили по вышеописанной методике.

.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что корм в процессе переваривания претерпевает существенные изменения на всем протяжении

ЖКТ как в содержании сухого вещества, так и в восстановительном эквиваленте (табл. 1).

Необходимо отметить, что включение в комбикорм танинов уменьшило восстановительный потенциал на 0,25 и 0,53 % по сравнению с его исходным состоянием. В зобе бройлеров контрольной группы, после потребления и обработки корма слюной, его ваккат-кислородное число незначительно возросло вследствие эндогенного обогащения кормовых масс секретом желез (на 3,9 %); влажность увеличилась на 24,0 %. В группах, получавших 0,3 и 0,6 % танинов, восстановительный потенциал содержимого зоба возрастал соразмерно с контрольной группой, в то время как влажность достоверно увеличилась до 29,6 и 31,7 %.

Переваривание в желудке у птицы контрольной группы сопровождалось интенсивной секрецией пищеварительных ферментов, о чем свидетельствует увеличивающаяся влажность (на 6,2-10,8 %) и энергоемкость кормовых масс по сравнению с содержимым зоба (на 6,1 %) (Черниговский, 1974). В опытных группах влияние танинов на интенсивность секреции желудка не носило достоверного характера – различия сопоставимы с контрольной группой. Однако с увеличением концентрации антифидантов в комбикорме, влажность кормовых масс желудка достоверно возрастала на 7,4-13,4 и 8,9-17,5 % по сравнению с содержимым зоба, что в среднем на 2-5 % больше по сравнению с 1-й группой. Отчасти это можно объяснить усиленным потреблением воды птицей для целей метаболической инактивации танинов в организме (Дмитров и др., 1986; Ермаков, 1987).

В желудке происходит лишь разрушение клеточных оболочек соединительной ткани, совершается частичное расщепление белков и структурная ломка их молекул. Основная же глубокая механическая и химическая обработка желудочного содержимого происходит в 12-перстной и тонкой кишках. В полость кишки изливается сок поджелудочной железы и желчь, резко меняющие рН желудочного химуса, которые вместе с кишечным соком обеспечивают дальнейший гидролиз питательных веществ при участии ряда ферментов (Черниговский, Соловьев, 1974; Vernow et al., 1999). Это непосредственным образом сказывается на восстановительном потенциале кормовых масс.

В контрольной группе ваккат-кислородное число дуоденального химуса достоверно снизилось в 1,7 раза по сравнению с содержимым мышечного желудка и составило 678,9 мл O_2 : г сухого вещества химуса, в то время как в опытных группах оно достоверно снизилось в 1,5-1,25 раза, но было достоверно менее значимым по сравнению с контролем.

Таблица 1. Содержание сухого вещества (%) и ваккат-кислородное число содержащего пищеварительного тракта птицы (мл O₂; г ВСВ) при разных уровнях танина

		Комбикорм	Esophagus (Зоб)	Gastricus		Кишечник						Помет
				Мышечный	Железистый	Intestinum tenue			Intestinum crassum			
						Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon	Rectum	
Основной рацион												
Содержание сухого вещества, %	87,43 ±0,53	59,41** ±0,54	48,62** ±0,64	53,20** ±0,68	15,36** ±0,86	17,24 ±0,62	17,90 ±1,39	14,82 ±0,64	21,73** ±1,12	21,31 ±0,87	23,02 ±1,01	
Ваккат-кислородное число, мл O ₂ : г СВ	1048,7 ±60,4	1089,3 ±85,8	1071,7 ±98,7	1155,4 ±105,3	678,9** ±71,8	725,9 ±50,9	850,0 ±41,9	782,5 ±80,9	1023,6 ±62,0	1267,6* ±70,7	1271,4 ±81,2	
ОР с 0,3 % танина в комбикорме												
Содержание сухого вещества, %	88,19 ±0,44	58,63** ±1,83	45,21* ±1,66	51,2* ±1,01	данных нет	16,72 ±0,57	15,13 ±1,43	14,47 ±1,21	20,82** ±1,48	20,32 ±1,17	20,84 ±0,13	
Ваккат-кислородное число, мл O ₂ : г СВ	1046,0 ±89,7	1089,6 ±71,7	1087,3 ±97,8	1148,6 ±41,8	770,1** ±53,4	684,1 ±59,0	902,6* ±47,5	700,6 ±80,4	1340,5* ±59,5 ^K	1600,2* ±117,6 ^K	1598,5 ±60,8 ^K	
ОР с 0,6 % танина в комбикорме												
Содержание сухого вещества, %	87,77 ±1,25	56,08** ±0,85 ^{KK}	38,62** ±0,23 ^{KK}	47,23** ±1,52 ^K	17,21** ±0,77 ^K	17,51 ±1,47	19,08 ±0,31	16,58 ±1,40	22,44** ±1,21	14,52** ±0,64 ^{KK}	15,62 ±0,52 ^{KK}	
Ваккат-кислородное число, мл O ₂ : г СВ	1043,2 ±71,5	1086,2 ±81,24	1085,3 ±43,0	1128,9 ±81,7	899,2* ±63,4 ^K	976,0 ±92,2 ^K	961,9 ±46,4 ^K	823,2 ±86,2	1498,2* ±58,5 ^K	1683,2 ±46,7 ^K	1692,5 ±78,3 ^K	

Примечание. ^K P ≥ 0,95 – достоверно по сравнению с контрольной группой; * P ≥ 0,95 – достоверно по сравнению с предыдущим участком ЖКТ.

Снижение энергоемкости содержимого дуоденум в некоторой степени можно объяснить интенсивным перевариванием, «расслоением фаз» корма и активным транспортом гидролизантов через стенку кишечника, что и обуславливает фиксируемые изменения ваккат-кислородного числа (Pour Reza, Edriss, 1977). С другой стороны, процессы гидролиза, протекающие в дуоденум, с точки зрения химии, есть присоединение воды к макромолекулам биополимеров корма. Поэтому «переход» воды из свободного состояния в структурно-молекулярную часть мономеров будет увеличивать абсолютную массу свободных продуктов гидролиза, но относительная энергоемкость единицы сухого вещества будет снижаться пропорционально степени гидролиза (Elkin, Rogler, 1990; Garcia, Maier, 1995).

Содержание сухого вещества в дуоденальном химусе также было минимальным по сравнению с остальными участками. Однако при 0,6 % уровне танинов в рационе влажность химуса достоверно уменьшилась, показывая, что танины ингибируют секрецию пищеварительных желез 12-перстной кишки по сравнению с контрольной группой; абсорбция воды возрастала. В этой связи увеличение ваккат-кислородного числа (на 32,4 %) и относительного содержания сухого вещества дуоденального химуса (на 18,6 %) во 2-й опытной группе является признаком достоверно значимого угнетения переваримости и абсорбции питательных веществ кормов на рассматриваемом участке пищеварительной трубки (Diao et al., 1999; Elkin, Rogler, 1990; Методы биохим. анализа, 1997).

Далее, по мере прохождения корма по тонкому кишечнику, его энергоемкость постепенно увеличивалась на всем протяжении. В целом за время прохождения корма от 12-перстной до ободочной кишки ваккат-кислородное число химуса птицы контрольной группы увеличилось с 678,9 – в 12-перстной до 850,0 мл O_2 : г сухого вещества – в подвздошной кишке. Несколько уменьшилась его влажность – с 84,66 до 82,41 %.

При сохранении аналогичной тенденции у бройлеров опытных групп потенциальная энергоемкость химуса тонкого кишечника оставалась достоверно выше контрольной группы. Разность восстановительного потенциала химуса от 12-перстной до подвздошной кишок в 1-й и 2-й опытных группах составила 570,4 и 599,0 мл O_2 :г СВ. Таким образом, 0,3 и 0,6 % уровень танинов достоверно уменьшал эффективность использования кормов в тонком кишечнике в 1,65 и 1,84 раза по сравнению с аналогичным участком у контрольных сверстников. Однако у птицы, получавшей 0,3 % танинов, химус тощей кишки обладал минимальным ваккат-кислородным числом в сравнении с предшествующими участками, а при 0,6 % танинов – подвздошной. Вероятно, в случае метаболического угнетения слизистой кишечника всасывание питательных веществ затрудняется и переносится на дистальные участ-

ки. Данные изменения, по-видимому, также можно объяснить включением компенсаторных механизмов: при угнетении пищеварения в дуоденум после инактивации танинов оно активизируется на низлежащих участках тонкого кишечника (Гулюшкин, Ленкова, 2002; Черниговский, Соловьев, 1974; Garcia, Maier, 1995).

В толстом кишечнике функциональная интенсивность абсорбции выражена менее отчетливо. Тем не менее, в проксимальных отделах толстого кишечника, преимущественно в терминальном отделе подвздошной и слепых отростках, продолжают процессы переваривания, чему способствует оптимальная влажность. Здесь с помощью энзимов, выделяемых кишечными бактериями, протекает переваривание некоторых видов клетчатки, благодаря чему и, особенно в связи с всасыванием воды (которое в толстой кишке проходит весьма энергично), пищевой химус постепенно превращается в каловые массы (Методы биохим. анализа, 1997; Douglas et al., 1993).

В нашем исследовании наиболее интенсивные гидролитические процессы в *caecum* отмечались в контрольной и 1-й опытной группах, что также можно рассматривать как биологическую компенсацию. В группе, получавшей 0,6 % полифенола, интенсивность микробного расщепления в слепых отростках была явно недостаточной. Низлежащие участки *intestinum crassum* характеризуются незначительной абсорбцией питательных веществ через стенку кишечника. Пищеварение в толстом кишечнике не способно компенсировать всасывание, происходящего в тонком, поэтому питательные вещества, не переварившиеся и не всосавшиеся в *intestinum tenue*, практически не используются организмом (Garcia, Maier, 1995; Jimenez Ramsey et al., 1994; Pour Reza, Edriss, 1997; Vernon et al., 1999).

Восстановительный потенциал содержимого толстого кишечника по мере продвижения субстрата возрастает. Некоторые исследователи объясняют данные изменения увеличением концентрации непереваримых веществ и абсорбцией воды в низлежащих участках тонкого кишечника. Поэтому преобладание непереваренных, но потенциально энергоемких веществ в единице сухого вещества повышает восстановительный потенциал его содержимого (Черниговский, Соловьев, 1974).

В ректальной части кишечника корм не претерпевает изменений в энергоемкости, исключением является его часть – *cloaca*, сообщение которой с мочеполовой системой обуславливает достоверное увеличение энергоемкости помета на 23,8; 19,4 и 12,3 % и влажности на 0,42-2,92 % по сравнению с химусом ободочной кишки (Метод. рекомендации..., 1999).

Полученные результаты были дополнены балансовыми опытами. Исследование средних образцов корма и помета показало, что «обменная энергия» комбикорма (выраженная в литрах кислорода) в опыт-

ных группах уменьшилась на 3,2 и 14,6 %. Использование обменной энергии от валовой составило 77,8; 75,3 и 65,4 % в контрольной и опытных группах, соответственно. Переваримость воздушно-сухого вещества кормосмесей в эксперименте была 83,0; 81,7 и 77,4 %.

Суточная энергоемкость мочи, определенная как разность ваткат-кислородного числа помета и кала, оказалась выше на 17,0 и 33,1 % у птицы опытных групп, что является прямым следствием нарушения обмена веществ, в результате чего снижался КПД организма в метаболическом превращении переваренной энергии комбикормов (Черниговский, 1974; Методы биохим. анализа, 1997; Метод. рекомендации..., 1999).

При применении танинов нужно обращать внимание на изменение влажности химуса и помета бройлеров. В литературе имеются сведения о снижении негативного влияния полифенолов в присутствии воды, потребляемой птицей. Оно в большей степени характерно для водоплавающей птицы, которая в меньшей степени подвержена негативному влиянию конденсированных антифидантов. Механизм действия основан на том, что в пищеварительном тракте вода способна стимулизовать конденсацию свободных продуктов гидролиза с танинами, инактивируя последние. Кроме того, на способности воды «вымывать» растворимый танин из корма (уменьшая его содержание в нем) основан технологический прием «вымачивания» компонентов, содержащих повышенный уровень фенольных антифидантов (Дмитров и др., 1986; Elkin, Rogler, 1990; Garcia, Maier, 1995).

В нашем случае, при включении в кормосмесь чрезмерного количества танинов, у цыплят возможно также проявление данного защитного механизма, что наглядно подтверждается следующими данными. Выделение воды с пометом в контрольной группе составило 99,9 г: (гол сутки), в опытных группах – 136,0 и 257,4 г: (гол сутки). С учетом влажности корма баланс воды в опытных группах характеризовался дополнительным потреблением ее птицей на 43,5 и 194,4 % по сравнению с контрольной группой. В этом аспекте вполне закономерным является существенное увеличение влажности содержимого в пищеварительном тракте (в зобе, желудке и особенно в прямой кишке). В результате усиленного потребления воды бройлерами опытных групп, масса помета у них увеличивалась в 1,3-2,3 раза по сравнению с контрольной группой.

Заключение

Уменьшение гидролитической и абсорбционной активности желудочно-кишечного тракта птицы, при использовании в рационах конденсированных дубильных веществ, наблюдается на всем его протяжении. Различия в переваримости питательных веществ у цыплят

опытных групп имели место уже в желудке и максимально были выражены в 12-перстной кишке. По мере продвижения кормовых масс всасывание продуктов гидролиза на низлежащих участках (тощая и подвздошная кишки) в целом также уменьшалось. Это подтверждается тем, что массы с большей энергоемкостью обнаруживались в толстом кишечнике, особенно в ободочной кишке (на 34,9 и 56,1 %), в кале и отчасти в помете птицы (на 26,2-25,7 и 32,8-33,1 %).

Однако, если при концентрации танина 0,3 % организм еще оказывался способным компенсировать угнетение пищеварения в верхних участках кишечника активизацией абсорбции на низлежащих, то 0,6 % уровень полифенола сопровождался глубокой депрессией процесса пищеварения. На всем его протяжении механизм биологической компенсации был выражен крайне незначительно, что вело к усиленному потреблению корма и снижению эффективности его трансформации в прирост тела.

Чрезмерные дозы танина вызывали угнетение обмена веществ и энергии. Уровень обменной энергии кормосмесей уменьшался не только за счет уменьшения переваримости питательных веществ, но и за счет неполного окисления метаболитов в организме. Калорийность мочи и ее количество возрастали пропорционально уровню антифиданта в кормосмеси.

Таким образом, для лабораторных исследований можно рекомендовать надежный и простой в техническом исполнении диагностический тест определения функции желудочно-кишечного тракта животных. Метод относительно дешевый по сравнению с дифференцированным определением всех показателей зоотехнического анализа или калориметрии. Воспроизводимость результатов высокая, при серийных анализах $C_v = 12,6$ %. Данный метод исследования можно использовать как альтернативу адиабатической калориметрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. Ч. 2. – Пятигорск. – 1996: 153 с.
2. Виноградов В.И., Мухин Е.А., Фролов С.Ф. Ветеринарная фармакология с рецептурой. – М.: Колос, 1998: 360 с.
3. Гулюшин С.Ю., Ленкова Т.Н. Влияние танинов на интенсивность тканевого дыхания цыплят. – Сб. научн. трудов ВНИИТИП, 2002, 41: 52-63.
4. Дмитриев С., Джуров А., Антонов С. Диагностика отравлений животных. М.: Агропромиздат. 1986: 245 с.
5. Ермаков А.И. Танины. В кн. Методы биохимических исследований растений. 1987: 420 с.
6. Методические рекомендации по кормлению сельскохозяйственной птицы. Под общ. редакцией В.И. Фисинина. ВНИТИП, Сергиев Посад, 1999.
7. Методы биохимического анализа (справочное пособие) под общ. ред. Б.Д. Кальницкого. ВНИИФБиП, Боровск, 1997: 352 с.

8. Танины. В сб. научных тр.: Химические вещества зерновых культур, ВИР, 1971, 77: 57-60.
9. Черниговский В.Н., Соловьев А.В. Физиология пищеварения. – Л.: Наука, 1974: 737 с.
10. Bagliacca M., Paci G., Marzoni M., Biagi G., Avanzi C. Effect of sorghum tannin on metabolic profile of Muscovy and common ducks (*Cairina moschata* L. and *Anas platyrhynchos* L.). Annali della Facolta di Medicina Veterinaria di Pisa. 1996, 49: 87-94.
11. Diao QiYu, Qi Guang Hai, Diao Q.Y., Qi G.H., Brooker J.D. Tannins in livestock feeds in China. Tannins in livestock and human nutrition. Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May 2 June 1999: 66-70. (Australian Center for International Agricultural Research).
12. Douglas J.H., Sullivan T.W., Gonzalez N.J., Beck M.M. Differential ages response of turkeys to protein and sorghum tannin levels. Poultry Sci., 1993, 72, 10: 1944-1951.
13. Elkin R.G., Rogler J.C. Comparative effect of dietary tannin in ducks, chicks and rats (Metabolism and Nutrition). Poultry Sci., 1990, 69, 10: 1685-1693.
14. Farrell D.J., Perez Maldonado R.A., Brooker J.D. Tannins in feedstuffs used in the diets of pigs and poultry in Australia. Tannins in livestock and human nutrition. Proceedings of an International Workshop, Adelaide, Australia, 31 May 2 June 1999: 24-29. (Australian Centre for International Agricultural Research)
15. Garcia D.C., Maier J.C. Reducao do teor de tanino no sorgo mediante moagem e armazenamento dos graos e sua acao sobre o desempenho de pintos na fase inicial. Rev. Soc. Brasil. Zootecn., 1995, 24, 1: 70-77.
16. Jimenez Ramsey L.M., Rogler J.C., Housley T.L., Butler L.G., Elkin R.G. Absorption and distribution of ¹⁴C-labeled condensed tannins and related sorghum phenolics in chickens. J. Agr. Food Chem., 1994, 42, 4: 963-967.
17. Pour Reza J., Edriss M.A. Effects of dietary sorghum of different tannin concentrations and tallow supplementation on the performance of broiler chicks. Brit. Poultry Sci., 1997, 38, 5: 512-517.
18. Vernon B.G., Caygill J.C., Mueller H. I. Tannins: implications for non ruminants. Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding. 1999: 41-49. (Nottingham University Press, Nottingham, UK).
19. Методические рекомендации: Определение обменной энергии в кормах. Под ред. Ш.А. Имангулова, И.А. Егорова, П.Н. Панькова и др. Сергиев Посад, 1999: 21 с.

РАЗРАБОТКА МАЛОКОМПОНЕНТНЫХ КОНЦЕНТРАТНЫХ ДОБАВОК НА ОСНОВЕ СЕМЯН РАПСА И ЗЕРНОБОБОВЫХ

А. П. Гаганов, А.С. Ершов, Н. Г. Григорьев
ВНИИ кормов им. В. Р. Вильямса.

Разработаны и испытаны рецепты малокомпонентных добавок с викой и бобами. Установлено их положительное влияние на пере-

варимость и использование питательных веществ рационов валухами. Даны рекомендуемые нормы их ввода в рацион.

Введение

Уровень обеспеченности скота кормами и кормовым белком в Российской Федерации ниже аналогичных показателей зарубежных стран с развитым молочным скотоводством в 1,3-1,5 раза (Тащилин, Якушев, 1997). В настоящее время из-за отсутствия денежных средств для скармливания крупному рогатому скоту используют зерно собственного помола, отруби и относительно дешевые, низкосортные по содержанию энергии и протеина комбикорма. Использование концентратов, которые не способны устранить дефицит энергии и протеина в рационах крупного рогатого скота, вызывает снижение продуктивности, значительно удорожает производство продукции, уменьшает зоотехническую эффективность и рентабельность скотоводства. Одним из путей повышения энергетического и протеинового потенциала концентрированных кормов является использование в их составе семян зернобобовых и масличных (рапс) культур.

Многие годы семена бобовых культур рассматриваются как возможный источник пополнения белка в рационах животных. Однако они не находят широкого применения в кормлении жвачных животных из-за содержания в них антипитательных веществ, отрицательно влияющих на обменные процессы и продуктивность животных. Для повышения питательной ценности семена бобовых культур подвергают различным видам обработок. При этом наибольший интерес представляет высокотемпературное воздействие и, в частности, экструдирование.

В процессе экструдирования, наряду с изменением физико-химических характеристик обрабатываемого продукта, снижается расщепляемость протеина и увеличивается переваримость кормов, содержание сахара, наблюдается желатинизация и декстринизация крахмала. Происходит инактивация ингибитора трипсина и мирозиназы, уменьшается содержание глюкозинолатов, уничтожаются или дезактивируются до безопасных уровней все микроорганизмы, а также могут денатурироваться афлотоксины и микотоксины (Росляков, 1977; Фотов, 1989; Чепняев, 1992; Denain, 1986; Kozłowska et al., 1983; Hanzaham, 1987; Мокрушина, 2001).

Исходя из этого мы провели исследования, целью которых явилась разработка рецептуры малокомпонентных кормовых добавок (МКД) на основе злакового зерна, семян рапса, вики и бобов. Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить влияние обработки и состава малокомпонентных кормовых добавок на переваримость питательных веществ рационов валухами.

2. Установить оптимальный уровень бобового компонента (вики и бобов) в составе малокомпонентных кормовых добавок.

Материал и методы

Для выполнения поставленных задач были проведены научные эксперименты по изучению переваримости питательных веществ рационов методом групп на валухах романовской породы в условиях вивария в трех повторностях. Основными методами исследований были физиологические опыты по изучению переваримости рационов, лабораторный и статистический (Журавлев, 1963; Петухова и др., 1989; Томме, 1969; Меркурьева, 1970; Григорьев и др., 1988, 1989, 1990; Овсянников, 1976; Калашников, 1986).

Испытанные рецепты малокомпонентных кормовых добавок (МКД) представлены в таблицах 1 и 2. Схемы физиологических опытов на валухах по определению влияния МКД на переваримость рационов представлены в таблицах 3,4. Малокомпонентные добавки готовили на маслопрессе ПШМ-250.

Таблица 1. Рецептура МКД с викой (количество по СВ, %)

Показатель	Рецептура		
	№ 1	№ 2	№ 3
Вид обработки	Размол	ПШМ-250	ПШМ-250
Зерна ячменя	80	80	65
Вика	20	20	20
Семена рапса	—	—	15
Итого:	100	100	100

Таблица 2. Рецептура МКД с викой и бобами (количество по СВ), %

Ингредиенты	Рецептура		
	N 1	N 2	N 3
Злаковое зерно	70	55	40
Бобовый компонент	15	30	45
Семена рапса	15	15	15
Итого:	100	100	100

Таблица 3. Схема опытов на валухах при использовании МКД с викой

Показатель	Структура рационов, по СВ		
Номер рецепта	1	2	3
Силос кукурузный	75	75	75
Кормовая добавка (МКД)	25	25	25
Итого:	100	100	100

Таблица 4. Схема опытов на валухах при использовании МКД с викой и бобами

Показатель	Состав рационов, по СВ					
	Номер рецепта	1	2	3	4	5
Силос кукурузный	63-65	42-46	63-65	42-46	63-65	42-46
Сено злаковое	11-12	11-12	11-12	11-12	11-12	11-12
Кормовая добавка (МКД)	24-25	43-46	24-25	43-46	24-25	43-46
Итого:		100	100	100	100	100

Результаты и обсуждение

При разработке рецептуры и способов приготовления исходили из того, что малокомпонентные кормовые добавки должны обладать высоким энергетическим и протеиновым потенциалом. Уровень бобового компонента и количество кормовых добавок в рационах животных должны оказывать положительное влияние на переваримость питательных веществ рационов и продуктивность животных. Стандартные комбикорма содержат, как правило, от 14 до 22 % сырого протеина и от 11 до 13 МДж/кг СВ обменной энергии. В стартерных комбикормах для телят уровень сырого протеина доходит до 24-25 %. (Крохина и др., 1990). Энергетический потенциал малокомпонентных кормовых добавок повышали за счет семян рапса. В качестве белкового ингредиента использовали вику яровую сорта Луговская-85 и детерминантные кормовые бобы сорта Укко.

При выращивании вико-ячменной кормосмеси можно получить зернофураж, содержащий примерно 80 % злакового зерна и 20 % семян вики. Данная зерновая кормосмесь представляет собой практически готовый концентрат, который можно использовать в кормлении скота. Аналогичные по составу МКД, размолотые и обработанные на маслопрессе ПШМ-250 с добавкой 15% семян рапса (табл. 1), были апроби-

рованы в рационах валухов. Кормовые добавки, состоящие из зерна ячменя и вики, содержали 12,0 МДж/кг СВ обменной энергии и 22,2 % сырого протеина, с добавлением семян рапса - 13,2 МДж/кг СВ обменной энергии и 23,4 % сырого протеина. Влияние методов обработки и рецептуры МКД на переваримость питательных веществ рационов представлено в таблице 5.

Таблица 5. Влияние вида обработки и рецептуры МКД с викой на переваримость питательных веществ рационов (схема 3)

Номера рецептов	Вид обработки	Коэффициенты переваримости				
		СВ	СП	СЖ	СК	БЭВ
1	Размол	64,8	54,0	59,7	62,8	75,6
2	ПШМ-250	69,0	60,3	70,6	70,3	77,5
3	ПШМ-250	70,9	65,2	73,5	68,6	80,7

Данные табл. 5 свидетельствуют, что экструзивная обработка значительно повышает переваримость питательных веществ. Добавление семян рапса в состав МКД (3 группа) еще более увеличивают переваримость почти всех питательных веществ за исключением сырой клетчатки.

Нами проведены исследования и по выяснению влияния МКД с викой на переваримость питательных веществ рационов. Рецептура и схема опытов представлены в таблицах 2 и 4. Кормовые добавки с 15, 30 и 45 % уровнем вики содержали 18,6, 20,3 и 23,8 % сырого протеина и 13,4, 13,5 и 13,7 МДж/кг СВ обменной энергии. Результаты опытов по переваримости питательных веществ рационов в зависимости от уровня вики в составе МКД и самих добавок в рационе представлены в таблице 6.

В состав рационов кормовые добавки включали в количестве 25 %. Увеличение количества вики в составе кормовой добавки с 15 до 30% не повлияло существенным образом на переваримость сырого протеина, сухого и органического вещества. Увеличение бобового компонента с 30 до 45 % снизило переваримость сухого вещества на 6,1 %, БЭВ на 5,5 % и органического вещества на 5,4 %. Повышение уровня кормовых добавок в структуре рациона (с 25 до 45,5 %) способствовало повышению переваримости сухого вещества на 6,4; 3,5 и 7,3 %, БЭВ на 7,4; 8,1 и 18,9 %, органического вещества на 6,8; 5,1 и 9,5 %. При этом уровень бобового компонента в МКД так же оказал влияние на переваримость питательных веществ рационов (табл. 6). Повышение доли ви-

ки в МКД с 15 до 30 и 45 % снизило переваримость сухого вещества на 2,3 и 2,6 %, сырой клетчатки на 0,6 и 19,6 %, органического вещества на 1,9 и 1,5 относительных процента.

Таблица 6. Влияние малокомпонентных кормовых добавок с викой и зерном ячменя на переваримость питательных веществ рационов (схема 4)

Уровень вики в МКД, %	МКД в рационе, %	Коэффициенты переваримости					
		СВ	СП	СЖ	СК	БЭВ	Органическое вещество
15	25	62,2	65,3	72,4	48,4	72,6	64,8
30	25	62,5	65,8	79,8	52,1	69,3	64,6
45	25	58,7	69,3	85,7	42,7	65,5	61,1
15	45,5	66,2	65,1	79,5	46,2	78,0	69,2
30	45,5	64,7	66,7	82,7	45,9	74,9	67,9
45	45,5	63,0	65,5	82,8	40,6	77,9	66,9

В исследованиях по влиянию МКД с бобами на переваримость питательных веществ рационов установлено, что концентрация обменной энергии в МКД, приготовленных с зерном из ячменя, составила 13,6; 13,7 и 13,9 МДж/кг СВ, сырого протеина 18,9; 20,1; 22,7 % соответственно. Результаты физиологических опытов по переваримости питательных веществ рационов в зависимости от уровня бобов в составе кормовых добавок и самих добавок в рационе представлены в таблице 7.

Таблица 7. Влияние малокомпонентных кормовых добавок с бобами и зерном ячменя на переваримость питательных веществ рационов (схема 4)

Уровень бобов в МКД, %	МКД в рационе, %	Коэффициенты переваримости					
		СВ	СП	СЖ	СК	БЭВ	органического вещества
15	24	64,6	59,4	71,2	60,7	74,0	67,5
30	24	67,6	64,0	76,4	62,9	73,2	69,4
45	24	69,9	66,4	76,8	71,1	73,6	71,9
30	43	68,0	67,8	77,7	58,8	74,1	70,0
45	43	70,5	69,3	83,6	59,0	77,7	72,6

Малокомпонентные кормовые добавки включали в состав рационов в количестве 24 % по сухому веществу. Данные таблицы 7 свидетельствуют о том, что рационы, содержащие кормовые добавки с 15 % уровнем бобов, имели среднюю переваримость питательных веществ 64,6 % по СВ. Увеличение доли кормовых бобов в добавках до 30 и 45 % способствовало повышению переваримости сухого вещества на 4,8 и 8,2 %, сырого протеина на 7,7 и 11,8 %, сырой клетчатки на 3,6 и 17,1 %, органического вещества на 2,8 и 6,5 %.

Для установления предельных норм скармливания кормовых добавок, содержащих 30 и 45 % бобов, их уровень в рационах валухов увеличивали до 43 %. Повышение доли кормовых добавок в структуре рациона (с 24 до 43 % по СВ) при фиксированном уровне бобов в ней (30 и 45 %) обозначило тенденцию к увеличению переваримости сухого и органического вещества, увеличило переваримость сырого протеина на 5,9 и 4,4 %, сырого жира на 1,3 и 8,8 %, БЭВ - на 1,2 и 5,6 %. При этом переваримость сырой клетчатки уменьшилась на 6,5 и 17,0 относительных процента.

Увеличение доли бобового компонента в кормовой добавке с 30 до 45 % также способствовало повышению переваримости сухого и органического вещества на 3,7 %, сырого протеина на 2,2 %, сырого жира на 7,6 % и БЭВ на 4,8 %. Переваримость сырой клетчатки была практически одинаковой.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено что:

- экструзивная обработка МКД с викий повышает переваримость питательных веществ рационов по сравнению с необработанной (размол); добавление в МКД 15 % семян рапса взамен ячменя способствует дальнейшему увеличению переваримости питательных веществ рационов валухами;
- малокомпонентные кормовые добавки, включающие от 15 до 45 % (по СВ) семян вики и бобов, содержат от 13,4 до 13,9 МДж/кг СВ обменной энергии и от 18,6 до 23,8 % сырого протеина;
- малокомпонентные кормовые добавки, содержащие до 30 % вики и обработанные на экструдере, могут включаться в состав рационов жвачных животных до 46%;
- малокомпонентные кормовые добавки, содержащие до 45 % бобов, обработанные на экструдере, могут включаться в состав рационов жвачных животных до 43%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тащилин В. А., Якушев Д. В. Новая концепция решения проблемы кормового белка. Кормопроизводство, 1997, 1-2: 7-11.
2. Влияние режима экструзии на качество экструдата. Исследования по технологии производства продукции животноводства. 1986: 77-84.
3. Росляков Ю. И. Технология и оборудование для экструдирования. Комбикормовая промышленность, 1977, 5: 23-29.
4. Фотов П. Г. Эффективность использования экструдированных кормов (зерна) при откорме молодняка крупного рогатого скота. Интенсификация животноводства Волго-Вятского района. 1984: 77-80.
5. Чепняев Н. П. Технология комбикормового производства. (2-е издание доп. и переработ.). М.: Колос, 1992: 368.
6. Denain P. L'extrusion a see: effects et interet en alimentation, son aplication a la graine de soja. Rev. Med. Veter. 1986, 137, 6: 409-416.
7. Kozłowska H., Elkowier R., Gossow B. The effect of texturing on some biologically active compounds in sojabean and rapeseed flours. Acta alimend. pol. 1983, 9, 1-4: 15-21.
8. Hanrahan T. Anti-nutrition factoring feed ingredients. Pig. Internat. 1987, 17, 3: 40-41.
9. Мокрушина О. Г. Эффективность использования концентрированных кормов с разным уровнем и качеством протеина при кормлении высокопродуктивных коров. Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. М.: 2001.
10. Журавлев Е. М. Руководство по зоотехническому анализу кормов. М.: Сельхозиздат, 1963: 295.
11. Петухова Е.А., Бессарабова Р.Ф., Коленова А.Д., Антонова О.А. Зоотехнический анализ кормов. , 2-е изд. доп. и переработ. М.: Агропромиздат, 1989: 287.
12. Томме М.Ф.. Методика определения переваримости кормов и рационов. М., 1969:39.
13. Меркурьева Е. К. Биометрия в селекции и генетике с.-х. животных. М.: Колос, 1970: 423.
14. Методические указания по оценке энергетической и протеиновой питательности кормов для жвачных животных. Н. Г. Григорьев, Н. П. Волков, А. И. Фицев и др. М., 1988: 50.
15. Методические рекомендации по оценке кормов на основе их переваримости. Н. Г. Григорьев, Е. С. Воробьев, А. И. Фицев и др. М., 1989: 42.
16. Овсянников А. И. Основы опытного дела в животноводстве. М.: Колос, 1976: 304 с.
17. Оценка энергетической и протеиновой питательности кормов и рационов для крупного рогатого скота. Методические рекомендации. Н.Г. Григорьев, Н. П. Волков и др. - М.: ВО Агропромиздат, 1990.
18. Оценка качества основных видов кормов для жвачных животных (рекомендации). Н. Г. Григорьев, Н. П. Волков и др. - М.: ВО Агропромиздат, 1990.
19. Калашников А. П. Клейменов А. И., Баканов В. Н. и др. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. М.: Агропромиздат, 1986: 352.

20. Крохина В.А., Калашников А.П., Фисинин В.И. и др. Комбикорма, кормовые добавки и ЗЦМ для животных (состав и применение). Справочник (Под ред. Крохиной В.А.). М.: Агропромиздат, 1990: 304.

**Труды Всероссийского научно-исследовательского института
физиологии, биохимии и питания с.-х. животных.**
Сборник экспериментальных статей. Боровск, 2002, т.41, 149 с

*Утверждено к печати Ученым советом ВНИИ физиологии,
биохимии и питания с.-х. животных.*

Редактор издания	В.Д. Кальницкая
Компьютерная верстка	Л.Л. Полякова
Полиграфическое исполнение	А.В. Бочаров

Издательство ВНИИ физиологии, биохимии и питания
сельскохозяйственных животных. Лицензия ИД № 03641
Формат 70х100/16 Объем 9,6 п.л. (12,3 усл. п. л.) Тираж 100 экз.

249013 Калужская обл., г. Боровск, ВНИИФБиП с.-х. животных
тел. 546-34-15