

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОДЕЛЬНИЙ АНАЛІЗ УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ КОРМОВИХ ДОБАВОК

Л.В. ХУДА, Л.В. ГУМЕНЮК, О.І. ХУДИЙ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: l.khuda@chnu.edu.ua
humeniuk.liliana@chnu.edu.ua
o.khudyi@chnu.edu.ua

Одним із перспективних напрямів розвитку кормовиробництва є розробка функціональних кормових добавок на основі гідролітичних ферментних препаратів, які підвищують ефективність засвоєння нутрієнтів та збільшують продуктивність. Водночас в аквакультурі через імовірність швидкого вимивання добавок із корму у воду постає потреба забезпечення більшої стабільності та пролонгованої дії таких препаратів. У статті наведено результати експериментально-модельного аналізу ефективності іммобілізації ферментного препарату Протосубтилін на природному неорганічному носії – базальтовому туфі – з метою створення функціональних кормових добавок у технологіях вирощування риби. Для іммобілізації використано метод адсорбції ферментного розчину на подрібненому базальтовому туфі родовища «Полицьке-2», що характеризується високою пористістю, механічною міцністю та адсорбційною здатністю. Проаналізовано вплив типу іммобілізації (статичної чи динамічної), тривалості експозиції та температурного чинника на кількість ферментного препарату, адсорбованого на носії, а також на збереження його протеолітичної та амілолітичної активностей. Показано, що динамічні умови іммобілізації (перемішування) не сприяють підвищенню ефективності процесу й навіть знижують її при тривалій експозиції (3 години), що ймовірно пов'язано з порушенням стабільного зв'язування ферментів на поверхні носія. У статичних умовах встановлено збільшення кількості адсорбованого ферментного препарату при підвищенні температури з +20 °C до +30 °C, проте водночас зафіксовано значне зниження ферментативної активності, особливо протеолітичної, що обмежує доцільність використання вищих температур. Оптимальним варіантом іммобілізації визначено статичну адсорбцію протягом 1–3 годин при температурі +20 °C, що забезпечує найкраще поєднання достатньої кількості іммобілізованого препарату та збереження його каталітичних активностей. Отримані результати підтверджують перспективність використання базальтового туфу як ефективного, доступного та екологічно безпечного носія для створення ферментних функціональних кормових добавок, що сприятиме розвитку сучасних технологій у галузі кормовиробництва та аквакультури.

Ключові слова: іммобілізація ферментів, базальтовий туф, Протосубтилін, кормові добавки, протеолітична активність, амілази, аквакультура.

Вступ. Ферментні препарати як кормові добавки знаходять широке застосування в сучасному кормовиробництві завдяки здатності покращувати біодоступність поживних речовин корму (Liang et al 2022; Sureshkumar et al, 2023; Velázquez-De Lucio et al, 2021). Проте використання ферментів у нативній (вільній) формі часто супроводжується зниженням їх стабільності та активності під впливом зовнішніх чинників. Інженерна ензимологія активно розвивається у напрямку вдосконалення способів підвищення ефективності використання ферментних препаратів, зокрема за рахунок подовження їх терміну зберігання та стабілізації активності. Застосування біотехнологічних підходів до іммобілізації ферментів дозволяє подолати ці обмеження, суттєво підвищуючи тривалість збереження їх активності та

ефективність у технологічних процесах (Hao et al, 2024). Одним із найбільш перспективних підходів є іммобілізація ферментів на різноманітних органічних і неорганічних носіях (Jesionowski et al, 2014). Особливу популярність має метод іммобілізації шляхом адсорбції на твердих матрицях, який вирізняється простотою, економічністю та технологічною доступністю (Basso et al, 2019). Використання природних неорганічних матеріалів, таких як цеоліти, робить цей метод екологічно безпечним і придатним для широкого застосування. Серед таких носіїв увагу привертає базальтовий туф — пористий мінерал вулканічного походження, що має розвинену поверхню, високу адсорбційну здатність, механічну міцність і термостійкість. Ці властивості зумовлюють його придатність для фіксації біокаталізаторів та забезпечують

стабільність ферментних систем у різноманітних умовах (Datta et al, 2013; Zdarta, et al 2018; Yandri, et al 2022).

Базальтові туфи вже знайшли застосування у тваринництві як мінеральні кормові добавки, що служать джерелом мікроелементів. Одночасно з цим, для підвищення ефективності засвоєння поживних речовин у кормах використовують гідролітичні ферментні препарати. Передбачається, що іммобілізація таких препаратів дозволить підвищити їх стабільність у складі кормів для аквакультури, зменшуючи втрати активності внаслідок вимивання під час годівлі риб. У даній роботі об'єктом дослідження обрано ферментний препарат Протосубтилін — комплексний гідролітичний ензим мікробного походження, до складу якого входять протеолітичні та амілолітичні ферменти.

Мета дослідження — оцінити ефективність адсорбційної іммобілізації Протосубтиліну на базальтовому туфі в статичних та динамічних умовах за різної тривалості іммобілізації та впливі температурного фактору.

Матеріали та методи. Ферментний препарат Протосубтилін Г3х (активність лужних протеїназ – 11000 од./г, нейтральних протеїназ - 120 од./г, β -амілази- 300 од./г, β -глюканази - 200 од./г, ксиланази – 150 од./г) іммобілізували за допомогою методу адсорбційної іммобілізації на тверду природну матрицю – базальтовий туф з родовища «Полицьке-2», подрібнений до розміру часток діаметром 2 мм.

Використовували 1% розчин ферментного препарату у фосфатному буфері (рН 7,4). Наважку носія 1 г поміщали у 20 мл розчину ферментного препарату при температурі 20 °С.

Оцінювали ефективність статичної (без перемішування) та динамічної іммобілізації (із затосуванням лабораторного шейкера, 40 об./хв) за різної тривалості – протягом 0,5 год., 1 год., 3 год. Відділення нерозчинної компоненти суміші після іммобілізації проводили центрифугуванням при 3 тис. г. Ефективність іммобілізації оцінювали за різницею концентрації ферментного препарату у розчині до та після проведення процедури іммобілізації (Robescu, Bavaro, 2025). Концентрацію білка визначали за методом Лоурі. Кількість десорбованого ферментного препарату з пор туфу визначали після промивання твердої фази 100 мл дистильованої води та витриманням у 0,4 М натрій хлориді протягом 1 години. Після повторного центрифугування надосадову рідину відбирали для подальшого аналізу. Протеолітичну активність ферментного препарату за різних умов іммобілізації визначали за модифікованим методом Ансона з

використанням казеїну як субстрату. Амілолітичну активність оцінювали за методом Каравея. Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Іммобілізація ферментів на твердих неорганічних носіях шляхом адсорбції є одним із найпоширеніших методів підвищення їхньої стабільності та придатності до багаторазового застосування. У ролі носія ефективно може використовуватись базальтовий туф — пористий алюмосилікатний матеріал, здатний зв'язувати ферменти завдяки розвиненій поверхні. Показано, що базальтові туфи з родовищ України мають удвічі вищу адсорбційну здатність, ніж чистий базальт або природний цеоліт. Це зумовлено їхньою пористою структурою та мінералогічною різноманітністю, що створює багато гетерогенних ділянок (Trachet al, 2021) та дозволяє розглядати базальтовий туф як потенційний носій для зв'язування ферментів.

Адсорбційна іммобілізація передбачає утримання ензимів на поверхні носія завдяки неспецифічним електростатичним, гідрофобним, ван-дер-ваальсовим взаємодіям та водневим зв'язкам. Здійснення ефективної іммобілізації передбачає кропіткий підбір оптимальних умов для кожного конкретного варіанту носія.

Процедура адсорбційної іммобілізації включає змішування наважки ферменту та носія, проведення інкубації та, надалі, відокремлення нерозчинної матриці від розчинного ферментного препарату. Для оцінки ефективності іммобілізації нами було використано два підходи:

1. Оцінка вмісту загального білку, присутнього у розчині, до та після процедури іммобілізації. Враховуючи те, що в розчині, окрім ферментного препарату не містяться інші білки, вміст білка співвідноситься з кількістю ферментного препарату, присутнього у розчині. При цьому вважали, що чим більше білку залишається в розчині, тим менш ефективно ензим зв'язується з носієм.

2. Оцінка активності ферментного препарату в розчині до та після процедури іммобілізації. У ідеальному випадку іммобілізація ферментів не має призводити до втрати їх каталітичної активності, проте сама процедура іммобілізації – дуже чутлива до дії різних факторів (температура, рН, розмір пор носія тощо), які можуть спричинити зниження ферментативної активності (Robescu, Bavaro, 2025).

У процесі проведення статичної іммобілізації достовірних змін концентрації адсорбованого

ферментного препарату залежно від тривалості експозиції не зафіксовано (рис.1).

Неочікуваними виявились результати, отримані при динамічній іммобілізації – її ефективність або не відрізнялась від статичного варіанту (0,5-1 година), або значно поступалась (приблизно вдвічі менша) за умови

трьохгодинного струшування. Ймовірно, такі дані можуть вказувати на те, що тривале механічне навантаження перешкоджає нормальному закріпленню ферменту на поверхні сорбенту, що відповідно й може сприяти різкому зниженню ефективності іммобілізації саме за цих умов.

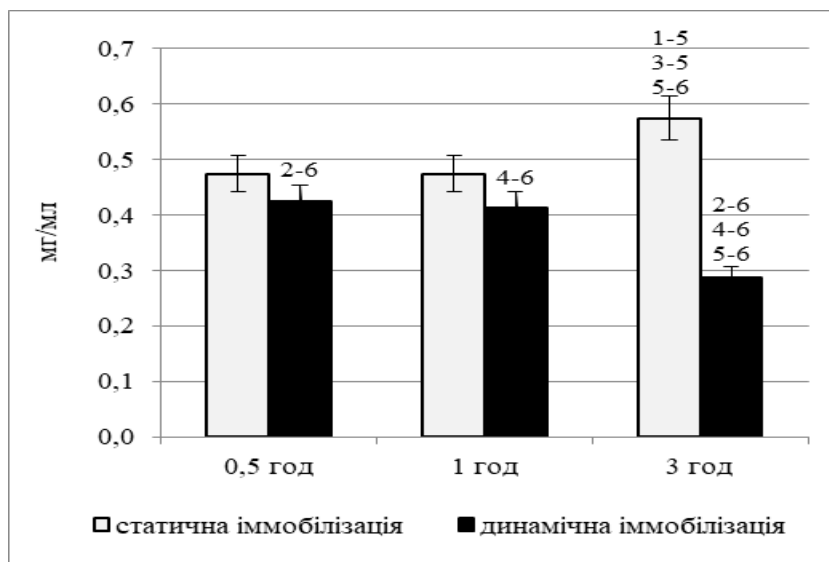


Рис.1 Кількість ферментного препарату, адсорбованого на базальтовому туфі за різних типів адсорбційної іммобілізації та тривалості експозиції

Примітка (тут та рис. 2.): номери дослідних груп
 1 – статична іммобілізація протягом 0,5 год,
 2 – динамічна іммобілізація протягом 0,5 год,
 3 – статична іммобілізація протягом 1 год,
 4 – динамічна іммобілізація протягом 1 год,
 5 – статична іммобілізація протягом 3 год,
 6 – динамічна іммобілізація протягом 3 год,
 2-6 – різниця достовірна ($p \leq 0,05$) між середніми відповідних дослідних груп.

Fig. 1 Amount of enzyme preparation adsorbed on basalt tuff under different types of adsorption immobilization and exposure duration

Note (here and fig.2.): the numbers of the experimental groups

1 – static immobilization for 0.5 h,
 2 – dynamic immobilization for 0.5 h,
 3 – static immobilization for 1 h,
 4 – dynamic immobilization for 1 h,
 5 – static immobilization for 3 h,
 6 – dynamic immobilization for 3 h,
 2-6 – the difference is significant ($p \leq 0.05$) between the means of the corresponding experimental groups.

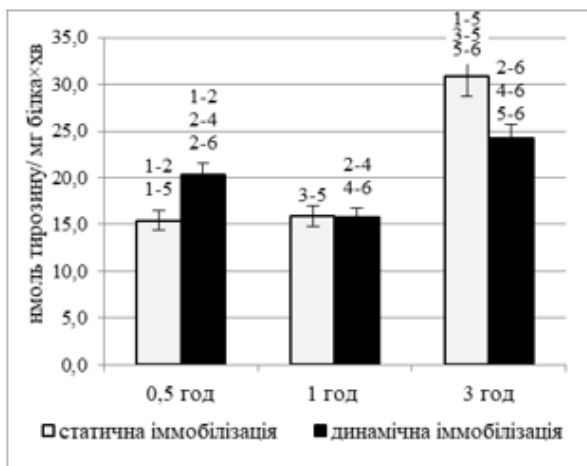
Результати, отримані при дослідженні кількості ензимного препарату, десорбованого з пор туфу, також вказують на зниження ефективності процесу при перемішуванні – різниця зі статичним варіантом при 3-годинній іммобілізації сягає 28%.

Важливо, щоб адсорбований ферментний препарат зберігав свою активність, адже іммобілізація може істотно вплинути на зв'язування активного центру ферменту з субстратом та призводити до часткової втрати каталітичної активності. Для перевірки цього нами були проведені дослідження з визначення основних ферментативних активностей, притаманних цьому ферментному препарату (рис.2).

Результати показали, що максимальна протеолітична (рис. 2А) та амілолітична

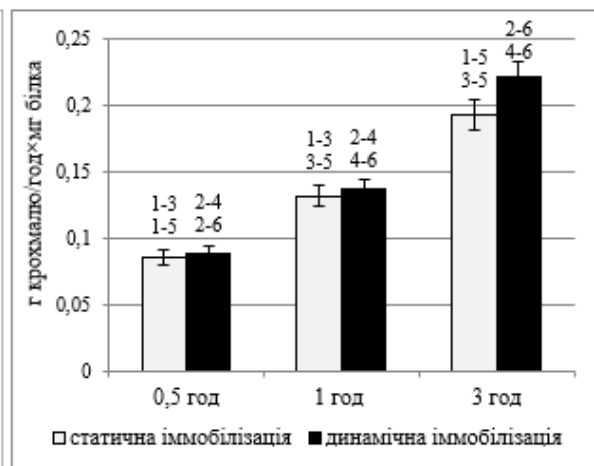
(рис. 2Б) активність ферментного препарату зберігається при 3-годинній іммобілізації у статичних умовах. Отже, нами показана недоцільність застосування досліджуваних умов динамічної іммобілізації (40 об/хв) для ферментного препарату Протосубтилін.

Як відомо, одним із факторів підвищення ефективності іммобілізації є температура. При помірному збільшенні температури спостерігається пришвидшення руху молекул, що може покращити контакт ферменту з носієм та збільшити кількість адсорбованого білка. З огляду на вище представлені результати досліджень, оцінка впливу температури на ефективність іммобілізації була здійснена за статичних умов.



A

Рис 2 Протеолітична (А) та амілолітична (Б) активність ферментного препарату за умов статичної та динамічної іммобілізації на базальтовому туфі



Б

Fig. 2 Proteolytic (A) and amylolytic (B) activity of the enzyme preparation under static and dynamic immobilization on basalt tuff

Встановлено, що кількість ферментного препарату, іммобілізованого на базальтовому туфі при 30 °С є вищою впродовж всього експерименту (рис. 3). Так, вже в першому часовому проміжку ефективність адсорбції

зросла на 20%, а 1-годинна іммобілізація виявилась майже в 1,5 рази продуктивнішою, ніж за відповідних умов при 20 °С. Така ж тенденція зберіглась і при 3 – годинній іммобілізації.

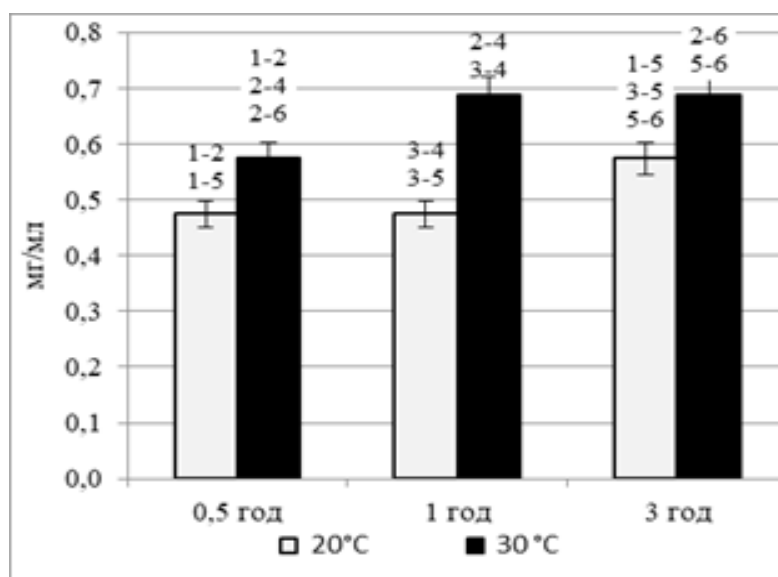


Рис. 3. Кількість ферментного препарату, адсорбованого на базальтовому туфі за умови статичної іммобілізації при температурах +20 °С та +30 °С

Примітка (тут та рис.4.): номери дослідних груп 1 – +20 °С протягом 0,5 год, 2 – +30 °С протягом 0,5 год, 3 – +20 °С протягом 1 год, 4 – +30 °С протягом 1 год, 5 – +20 °С протягом 3 год, 6 – +30 °С протягом 3 год, 2-6 – різниця достовірна ($p \leq 0,05$) між середніми відповідних дослідних груп.

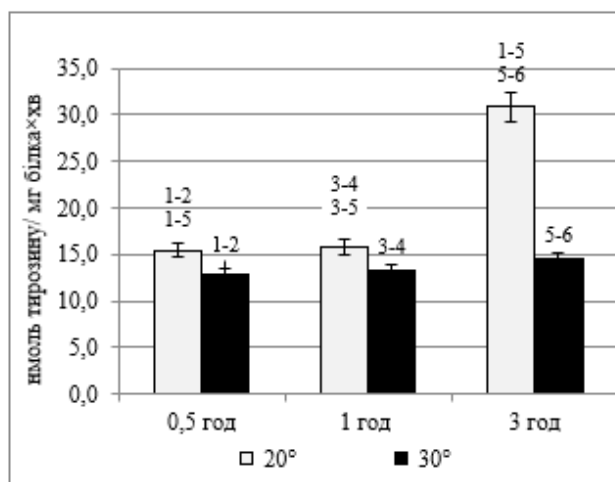
Fig. 3. Amount of enzyme preparation adsorbed on basalt tuff under conditions of static immobilization at temperatures of 20 °C and 30 °C

Note (here and fig.4.): the numbers of the experimental groups 1 – +20 °C for 0.5 h, 2 – +30 °C for 0.5 h, 3 – +20 °C for 1 h, 4 – +30 °C for 1 h 5 – +20 °C for 3 h, 6 – +30 °C for 3 h, 1-2 - the difference is significant ($p \leq 0.05$) between the means of the corresponding experimental groups..

Проте, виключно важливим є те, щоб за вказаних температурних умов поряд зі збільшенням кількості адсорбованих ферментних молекул також зберігалась їх активність.

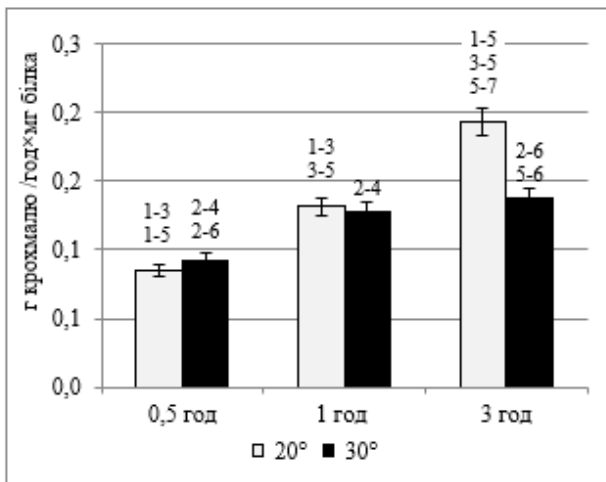
Результати оцінки активності амілаз та протеїназ Протосубтиліну за різних температур іммобілізації показали чітку тенденцію до зниження цих показників за умов підвищення температури на 10 °C (рис. 4). Різниця у впливі температур особливо проявляється при 3-годинній процедурі іммобілізації. За цієї

експозиції підвищення температури з +20°C до +30°C зменшило протеолітичну активність ферментного препарату більш як удвічі (рис. 4А), а амілолітичну активність – у 1,4 рази (рис. 4 Б). Суттєве зниження рівнів активності ферментів, які входять до складу ферментного препарату, нівелюють позитивні результати, отримані при дослідженні кількості Протосубтиліну, адсорбованого на туфі при температурі +30 °C.



А

Рис 4 Протеолітична (А) та амілолітична (В) активність ферментного препарату за умов статичної іммобілізації на базальтовому туфі при температурах +20 °C та +30 °C



Б

Fig. 4 Proteolytic (A) and amylolytic (B) activity of the enzyme preparation under static immobilization on basalt tuff at temperatures of +20 °C and +30 °C

Висновки. Динамічні умови іммобілізації не призводять до змін кількості ферментного препарату, адсорбованого на поверхні та в порах носія при 0.5-1- годинній експозиції у порівнянні з статичним методом та зменшують концентрацію ферментного препарату при 3-годинній іммобілізації. Проведення процедури іммобілізації при температурі +30 °C призводить до зростання кількості адсорбованого на носії ферментного препарату, проте істотно знижує його активність. Рівні протеолітичної та амілолітичної активностей Протосубтиліну знижені в найбільшій мірі при 3-годинній іммобілізації за 30 °C.

Список використаної літератури / References:

1. Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes: A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
2. Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: An overview on

З огляду на кількість Протосубтиліну, адсорбованого на поверхні та в порах носія, а також ферментативну активність його основних складових оптимальним варіантом є проведення 1-3 годинної статичної іммобілізації 1% Протосубтиліну на базальтовому туфі при +20 °C.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що дослідження проводилося за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які можна було б витлумачити як потенційний конфлікт інтересів.

- techniques and support materials. *Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
3. Hao, X., Liu, P., & Chu, X. (2024). Recent advances in the strategies of simultaneous enzyme immobilization accompanied by nanocarrier synthesis. *Applied Sciences*, 14(9), 3702. <https://doi.org/10.3390/app14093702>
 4. Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*,

- 2014, т. 20, № 5, с. 801–821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>
5. Liang, Q., Yuan, M., Xu, L., & Lio, E. (2022). Application of Enzymes as a Feed Additive in Aquaculture. *Marine Life Science & Technology*, 4, 208–221. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00128-z>
 6. Robescu, M. S., & Bavaro, T. (2025). A comprehensive guide to enzyme immobilization: All you need to know. *Molecules*, 30(4), 939. <https://doi.org/10.3390/molecules30040939>
 7. Sureshkumar, S., Song, J., Sampath, V., & Kim, I. (2023). Exogenous Enzymes as Zootechnical Additives in Monogastric Animal Feed: A Review. *Agriculture*, 13(12), 2195. <https://doi.org/10.3390/agriculture13122195>
 8. Trach, Y., Tytkowska-Owerko, M., Reczek, L., & Michel, M. (2021). Comparison the Adsorption Capacity of Ukrainian Tuff and Basalt with Zeolite–Manganese Removal from Water Solution. *Journal of Ecological Engineering*, 22(3), 161–168. <https://doi.org/10.12911/22998993/132605>
 9. Velázquez-De Lucio, B. S., Hernández-Domínguez, E. M., Villa-García, M., Díaz-Godínez, G., Mandujano-Gonzalez, V., Mendoza-Mendoza, B., & Álvarez-Cervantes, J. (2021). Exogenous Enzymes as Zootechnical Additives in Animal Feed: A Review. *Catalysts*, 11(7), 851. <https://doi.org/10.3390/catal11070851>
 10. Yandri, Y., Ropingi, H., Suhartati, T., Hendri, J., Irawan, B., & Hadi, S. (2022). The Effect of Zeolite/Chitosan Hybrid Matrix for Thermal-stabilization Enhancement on the Immobilization of *Aspergillus fumigatus* α -Amylase. *Emerging Science Journal*, 6(3), 505–518. <https://doi.org/10.28991/ESJ-2022-06-03-06>
 11. Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 1–27. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>

EXPERIMENTAL-MODEL ANALYSIS OF ENZYME IMMOBILIZATION CONDITIONS FOR CREATING FUNCTIONAL FEED ADDITIVES

L.V. Khuda, L.V. Gumeniyk, O.I. Khudyi

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
e-mail: l.khuda@chnu.edu.ua
humeniuk.liliana@chnu.edu.ua
o.khudyi@chnu.edu.ua

One of the promising directions in the development of modern feed production is the creation of functional feed additives based on hydrolytic enzyme preparations, which increase the efficiency of nutrient assimilation and enhance overall productivity. At the same time, in aquaculture, due to the likelihood of rapid leaching of additives from the feed into the water, there is a need to ensure greater stability and prolonged action of such enzyme preparations. This paper presents the results of an experimental and model analysis of the efficiency of immobilizing the enzyme preparation Protosubtilin on a natural inorganic carrier — basalt tuff — with the aim of developing functional feed additives for use in fish farming technologies. The immobilization process was carried out by adsorbing an enzyme solution onto ground basalt tuff from the “Polytske-2” deposit, which is characterized by high porosity, significant mechanical strength, and excellent adsorption capacity. The study analyzed the effect of the type of immobilization (static or dynamic), exposure duration, and temperature factor on the amount of enzyme preparation adsorbed on the carrier, as well as on the retention of its proteolytic and amylolytic activities. It was shown that dynamic immobilization conditions (mixing) do not contribute to increased efficiency of the process and even reduce it with prolonged exposure (3 hours), which is probably due to the disturbance of stable enzyme binding on the carrier surface. Under static conditions, an increase in the amount of adsorbed enzyme preparation was observed with an increase in temperature from +20 °C to +30 °C; however, a significant decrease in enzyme activity, especially proteolytic activity, was also recorded, which limits the feasibility of using higher temperatures. The optimal immobilization mode was determined to be static adsorption for 1–3 hours at +20 °C, which ensures the best combination of sufficient enzyme binding and retention of catalytic activities. The obtained results confirm the potential of using basalt tuff as an effective, affordable, and environmentally safe carrier for creating enzyme-based functional feed additives, which will contribute to the development of modern technologies in feed production and aquaculture.

Keywords: enzyme immobilization, basalt tuff, Protosubtilin, feed additives, proteolytic activity, amylases, aquaculture.

Отримано редколегією 25.04.2025 р.

ORCID ID

Лідія Худа: <https://orcid.org/0000-0002-1098-7537>

Олексій Худий: <https://orcid.org/0000-0001-5652-0900>