

LIZOCĪMA PREPARĀTU IZLIETOŠANA LOPKOPĪBĀ UN FAKTORI, KAS IETEKMĒ TO FERMENTATĪVO AKTIVITĀTI

THE USE OF LYSOZYME PREPARATIONS IN CATTLE-BREEDING AND FACTORS INFLUENCING THEIR ACTIVITY

P.Andersons, U.Kauliņš, V.Mīkelsone, L.Vecmuktāne

LLU Ķīmijas katedra

Department of chemistry, LUA

D.Jonkus

LLU Dzīvnieku audzēšanas katedra

Department of animal growing, LUA

I.Remeze

Latvijas Medicīnas akadēmija

Latvian Medical Academy

Abstract: The article presents an original way how to obtain lysozyme preparations from hen eggs. Activity of lysozyme abnormally increases in large dilutions.

In trials with chicken broilers, piglets and calves paste-like additives of lysozyme increased the weight up to 6-24 %, as compared to the control group.

In four laboratory trials crystallic and paste-like lysozyme preparations caused an increase of T-lymphocytes in chickens ration on account of T-lymphocytes- helpers, as well as the increase of the ammount of B-cells in blood serums. Indexes of skin reaction are higher in comparison with the control group and reflect the increase of imunic reactivity of the body on account of T-lymphocytes and macrophages of the derm.

γ -globuline of blood serum - considerably higher than in the control group.

Key words: lysozyme, animal nutrition.

Lizocīms ir ferments (3.2.1.17.Mukopeptīd-N-acetilmuramilhidrolāze), kas katalizē β -1.4 saļu hidrolīzi mukopolisahāridos un mukopeptīdos. Lizocīms ledarbojas uz daudzu dažādu mikroorganismu šūnu apvalkiem (vājāk tas ledarbojas uz hītinu) kā polisahāridāze.

Kaut arī lizocīma preparāti, kas izdalīti no dažādām lizejvielām, strukturāll ir atšķirīgi, to antimikroblālā ledarbība vissumā ir līdzīga. Jāatceras tomēr, ka mikroorganismu producētais lizocīms daudz aktīvāk ledarbojas uz *E. coli*, nekā vistu olu lizocīms. Mikroblālā un dzīvnieku organisma lizocīma farmakoloģisko ledarbību nevar uzskatīt par identu. Lizocīma preparātus arvien plašāk sāk izmantot medicīnā, veterinārmedicīnā, farmakoloģijā un pārtikas rūpniecībā.

LLU ir izstrādātas valrākas metodes lizocīmu saturošu preparātu iegūšanai un rekomendācijas to izlietošanai lopkopībā un putnkopībā (В.Я.Микельсоне, 1986; У.Я.Каулиньш, 1987; П.П.Андерсон, 1988; Я.Я.Латвиетис, 1989). Līdz ar to aktuāls kļūst jautājums par lizocīma preparātu stabilitāti, aktivitātes izmaiņām, ledarbojoties dažādiem inhibitoriem un aktivatoriem, aktivitātes izmaiņām dažādos atšķaidījumos, kas lieš mērā ietekmē tā efektivitāti praktiskajā pielietošanā. Lizocīms pieder pie termostabilajiem fermentiem, kas nezaudē savu aktivitāti temperatūrās virs 90°C, kad citas olbaltumvielas plīnīgi denaturējas, noārdoties tā telpiskajām struktūrām.

Lizocīms ir stabils skābā vīdē (pH līdz 2). Zemākā pH vīdē lizocīma aktivitāte pakāpeniski samazinās. Sārmainā vīdē lizocīma preparāti ir mazāk stabili, tā izoelektrisks punkts atbilst pH 10.5-11. Lizocīma aktivitācijai nepieciešama neliela $NaCl$ vai citu sāmmetālu vai sārmzemju metālu sāļu piedevas. Paaugstinātas sāls koncentrācijas darbojas kā inhibitori. Kā parādīja mūsu novērojumi, $NaCl$ piedevas nedrīkst pārsniegt 3 %. No dažādām lizejvīlām izdalītie lizocīma preparāti ir atšķirīgi arī fermentatīvās aktivitātes un termostabilitātes ziņā (У. Я. Каулиньш, 1982). Kompleksiem sastāviem šīs novērojumi ne vienmēr ir plemērojami - to īpašības ir ļāpārbauda katrā atsevišķā gadījumā. Pētot mazāk termostabili zcsu olu lizocīma preparātu aktivitāti prolongētās darbības masā pie pH 2 un 85°C, tā aktivitāte samazinājās tikai par 1.3 reizes (no 32 000 v/mg līdz 25 000 v/mg) jeb apmēram trīs reizes mazāk nekā termiski daudz stabilākam vistu olu lizocīmam (no 18 0000 līdz 50 000 v/mg).

Specifiska ir dažādu organisko savlenojumu ietekme uz lizocīmu un tā aktivitāti. Fermentu inhibīb koncentrēts etilspīra šķidums un it īpaši dažādu liipīdu klātbūtnē. Tā 1 % olu eļļas piedevo 96 % etilspīra šķidumā 144 stundu laikā samazināja lizocīma fermentatīvo aktivitāti par 96.5-98 %, 1 % olu eļļas spīra ūdens šķidumā - par 60.7 %, 1 % oļvu eļļas piedevo - par 50 %, 1 % saulespuķu eļļas piedevo - par 37.4 % (V. Mīķelsons, 1987).

10 % ābolskābes kā arī citronskābes piedevas nedaudz samazināja lizocīma fermentatīvo aktivitāti, bet kādā no atkārtotajiem izmēģinājumiem 50 % ābolskābes piedevo izraisa nelielu aktivitātes pieaugumu - par 3.4 %. Aminoskābju klātbūtnē lizocīma aktivitāte pieauga, atsevišķos gadījumos pat par 80 % (glutamīnskābais).

Vairāku smago metālu sāļu klātbūtnē nelielās koncentrācijās lizocīma aktivitāti palielināja. Neparasta ir lizocīma fermentatīvās aktivitātes palielināšanās, preparātu atšķaidot ūdeni. Tā, piemēram, pakāpeniski šķidinot un pleckārtīgi atšķaidot kristālisko lizocīmu 0.5 % $NaCl$ šķidumā summārā aktivitāte pieauga 30.6 reizes (sk. 1. tabulu).

1. tabula/Table 1

Lizocīma summārās aktivitātes palielināšanās šķidinot ūdeni
Increase of summary activity of lysozyme by adding water

Lizocīma daudzums, mg Amount of lysozyme, mg	Pievienotais ūdens daudzums, ml Added amount of water, ml	Aktivitāte, vlenības/ml Activity, units per ml	Summārā aktivitāte, vlenības/ml Summary activity, units per ml
100	100	437.5	43.745
100	200	1850.0	370.000
100	500	13400.0	6700.000

Pagaldām vēl nav novērota stingra likumsakarība lizocīma aktivitātes pieaugumam atkarībā no preparāta atšķaldījuma. Fermenta aktivitātes pieaugumu, to atšķaidot, ietekmē valrāki blakus faktori, tai skaitā, lizocīma preparāta tīrības pakāpe un dažādu citu vielu plemāsījumu daudzums.

Pazīstama lizocīma preparātu antimikrobiālā, kā arī imunomodulatora iedarbība, attīritus kristāliskus preparātus ievadot injekciju veldā. Mēs izmēģinājumos ar cāliem *in vitro* pētījām lizocīma šķidumu transportēšanos caur zarnu sienīnām (izlietojot otrādi apgrīztais zarnu preparātus) un konstatējām, ka daja lizocīma vai no tā atšķeltie mazmolekulārie polipeptidi spēj pārvietoties caur zarnu sienīnām asinis (П. П. Андерсон, 1987).

Citādi nevar arī izskaldrot lizocīma saturu paaugstināšanos asinis cāliem, kas proporcionāla uzņemtā lizocīma preparāta daudzumam barībā, kā arī citu imunitāti raksturojošo rādītāju asins serumā palielinājumu cālu grupās, kas sanēma preparāta piedevas.

LLU Ķīmijas katedrā Izstrādātas oriģinālas tehnoloģijas lizocīmaktīvu preparātu legūšanai no vistu olu baltuma, nelzdot to tīrā veldā kā arī vienlalcīgi samazinot tripsīna inhibitora un avldīna aktivitāti. Izvēldoti pastvēda (sausnes satus 50 %, lizocīma aktivitāte 2 000 v/g) un sausl lizocīma preparāti (sausnes satus 90 %, lizocīma aktivitāte 18 000 v/g) (Я.Я. Латвиетис, 1989; У.Я. Каулиньш, 1987). Garantētals uzglabāšanas laiks pastvēda preparātam (pie zemām temperatūrām 2-5°C) ir 30 dienas, sausajam preparātam - ne mazāk par 6 mēnešiem.

Mūsu laboratorijas un ražošanas Izmēģinājumos republikas putnu fabrikās un salmniecībās 0.1-0.3 % pastvēda un 0.015-0.03 % sausā preparāta piedevas pamatbarībai (rēķinot uz tā sausni) par 25-30 % samazināja cāļu, sīvēnu un teju saslimstību ar dažādām infekcijas slimībām, kā arī palielināja vīdējos dzīvmasas pleaugumus par 6-24 %, saīdzinot ar kontroles grupām.

Lizocīmsaturošu preparātu izlietošana kā barības piedevas ietelcama teļiem plēna periodā līdz 2 mēnešiem, sīvēniem no 2 līdz 4 mēnešu vecumam un cāļiem līdz 45 dienu vecumam (П. Аnderсон, 1991), kad vērojams vislielākais efekts dzīvmasas pieauguma palielinājumam, saīdzinot ar kontroles grupām.

No vistas olas baltuma iegūtie lizocīmsaturošie preparāti neizraisa barības gremošanas traktā disbakteriozi, bet nomāc patogenos mikroorganismus un veicina vēlamās mikrofloras attīstību (У.Я. Каулиньш, 1982).

Izmēģinājumā Vissavienības zinātniskās un tehnoloģiskās putnkopības institūtā 1989. gadā ar cāļiem-broileriem vecumā no 1 līdz 48 dienām (100 cāļi katrā izmēģinājuma grupā) tika izlietotas 0.2, 0.3 un 0.4 % pēc mūsu metodes gatavotas pastvēda lizocīma piedevas. Lizocīma piedevas palielināja cāļu saglabāšanos par 2-9 %. Cāļiem-gallīšiem dzīvmasas pieauguma palielinājums nebija statistiski ticams. Cāļu-vistiņu organismi labāk reaģēja uz lizocīma piedevām - novēroja dzīvmasas pieauguma palielināšanos par 7.7 % un barības patēriņa 1 kg pieaugumam samazināšanos par 5-8.8 %, saīdzinot ar kontrolli. Proteīna un tauku sagremošanās preparātu piedevu ietekmē palielinājās par 3.9 un 4 %. Saīdzinājumā ar kontrolli, lizocīma satus asins serumā palielinājās par 15-22 % un γ -globuliņu satus asins serumā palielinājās vairāk nekā par 30 % (Т.Околелова, 1991).

Četros 40-dienu izmēģinājumos ar cāļiem mēs konstatējām, ka lizocīma preparāti barībā darbojas kā nespecifiski stimulatori organisma dabīgās rezistences palielināšanai. Izlietoti ķīmiski attīriți, kristalīskā lizocīma preparāti dozējumos 0.002, 0.004 un 0.005 % piedevās kā arī pastvēda preparāts (lizocīma aktivitāte 120 v/mg) 0.06 % piedevā cāļu kombinētās barības sastāvā. Izmēģinājuma beigās cāļu asins serumā noteicām T un B-limfocītu, T-limfocītu helperu un supresoru, albumīnu, globuliņu (α , β , γ frakciju), cirkulējošo īmūnielu kompleksu (CIK) saturu un ādas reakciju uz ievadīto fitohemaglutinīnu.

Šajos mēģinājumos konstatēts (sk. 2. tabulu), ka lizocīma preparātu piedevas visos gadījumos palielināja T-limfocītu kopējo, kā arī T-limfocītu helperu saturu, B-limfocītu saturu, γ -globuliņu saturu asins serumā, pastiprināja ādas reakciju uz ievadīto fitohemaglutinīnu ($P < 0.05$), stimulējoši ledarbojās uz ādas makrofagiem (П.П. Аnderсон, 1991).

Literatūra

1. Mikelsons V., Ozola L., Kaulliņš U., Andersons P., Ķerubiņa L., Bruns I. (1987). Vistu olu lizocīms un tā izmantošana pārtikas rūpniecībā. Pad. Latv. lauks., 8. 39-40.
2. Аnderсон П.П., Микельсоне В.Я., Каулиньш У.Я. (1987). Биологическое действие и эффективность использования препаратов лизоцима в качестве кормовых добавок в животноводстве. Матер. 3-ей конф. Актуальные вопросы обмена веществ. Вильнюс, 1987.
3. Аnderson П.П., Каулиньш У.Я., Степка А.Я., Берга М.Я. Биологически активная добавка к корму. SU 1.397.019, A 23 K 1/16; 22.01.88.

2. tabula/Table 2

Lizocīma piedevu ietekme cāļu barībā uz īmunitātes rādītājiem
 Influence of lysozyme additives in chickens feed on the indices of immunity

Izmēģinājuma Nr. No. of the trial	Mikropiedevas Microadditives	T-limfocīti, T-lymphocytes, %		T-limfocīti, helperi, % T-lymphocytes, helpers, %		T-limfocīti, supresori, % T-lymphocytes, suppressors, %		B-limfocīti, B-lymphocytes, %		Ādas reakcija uz fitohemaglutinīnu ievadišanu, nosacītās vienībās Skin reaction to infusion of phyto- hemagglutinine, units		γ-Globulinī asins serumā Blood serum γ-globuline	
		M±m	P	M±m	P	M±m	P	M±m	P	M±m	P	M±m	P
I	Lizocīma pasta 0.06 % Lysozyme paste Bez piedevām - kontrole Without additives - control	31±0.5	<0.01	26±0.5	<0.01	6±0.6	<0.05	9±2.3	<0.05	21±1.0	<0.01	-	-
		25±0.5	-	19±0.2	-	7±0.5	-	7±0.3	-	14±1.0	-	-	-
II	Lizocīms kristaliskais 0.005 % Lysozyme crystalline Bez piedevām - kontrole Without additives - control	-	-	-	-	-	-	-	-	41±3.8	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	28±1.2	-	-	-
III	Lizocīms kristaliskais 0.002 % Lysozyme crystalline Lizocīms kristaliskais 0.004 % Lysozyme crystalline Bez piedevām - kontrole Without additives - control	31±0.5	<0.05	22±0.3	<0.05	9±0.8	<0.05	11±1.9	<0.05	-	-	-	-
		31±0.5	<0.05	24±0.4	<0.05	7±0.8	<0.05	10±0.4	<0.05	28±4.3	<0.05	-	-
		26±0.5	-	19±0.2	-	7±0.6	-	9±0.3	-	18±1.9	-	-	-
IV	Lizocīma pasta 0.06 % Lysozyme paste Bez piedevām - kontrole Without additives - control	36±1.0	<0.05	28±1.1	<0.01	8±1.0	<0.05	15±1.1	<0.02	-	-	27	8.5
		28±0.5	-	21±1.1	-	7±0.3	-	9±0.5	-	-	-	18	6.8

4. Андерсон П., Каулиньш У., Каркла Л., Микельсоне В., Ремэз И. (1991). Создание и использование лизоцимактивных препаратов в качестве неспецифических стимуляторов роста и естественной резистентности организма цыплят, поросят и телят. Тез. докл. Всес. совещ. Новые аспекты участия биологически активных веществ в регуляции метаболизма с.-х. животных. Боровск, 1991. 116-117.
5. Андерсон П.П., Ремэз И.М.(1991). Новые стимуляторы резистентности у с.-х. животных и птиц. Труды Латв. с.-х. акад., 272. 30-47.
6. Каулиньш У.Я.(1982). Лизоцим. Рига, 59.
7. Каулиньш У.Я., Латвиетис Я.Я., Андерсон П.П., Микельсоне В.Я., Вецмуктане Л.Р. Способ получения лизоцимсодержащего препарата из яичного белка. SU 1.579.052, С 12 N 9/36, А 23 J 1/08; 21.12.87.
8. Латвиетис Я.Я., Фисинин В.И., Околелова Т.М., Андерсон П.П., Каулиньш У.Я., Микельсоне В.Я., Вецмуктане Л.Р., Поммер А.В., Берзинь-Берзите Р.В., Залите И.И. Способ получения лизоцимактивного препарата. SU 1.527.894, С 12 N 9/36; 08.08.89.
9. Микельсоне В.Я., Андерсон П.П., Каулиньш У.Я, Ляманович Р.А. Способ выделения лизоцима. SU 1.239.147, С 12 N 9/36; 23.06.86.
10. Околелова Т., Жабронова Н., Андерсон П., Каулиньш У. (1991). Лизоцимсодержащий препарат. Пищеводство, 11. 21-22.