

## PREGLED ISTRAŽIVANJA NA RAZVOJU MULTIENZIMSKOG PRIPRAVKA ZA HRANIDBU ŽIVOTINJA

## REVIEW OF THE RESEARCH ON DEVELOPMENT OF THE MULTIENZYMATIC PREPARATION FOR ANIMAL NUTRITION

**I. Marković, Branka Marković-Devčić, I. Groš, Lina Bačar-Huskić, N. Vranešić, T. Horvat, B. Stuburić**

Pregledno znanstveni članak  
UDK: 636.085.16.  
Primljeno: 21. travanj 1997.

### SAŽETAK

Osnovna svrha primjene enzima u tovu životinja je povećanje ekonomičnosti i kakvoće proizvedenog mesa. Da bi se to postiglo potrebno je odabrati odgovarajuće hidrolitičke enzime, usvojiti njihovu proizvodnju i razraditi način primjene, što uključuje vrlo opsežna interdisciplinarna istraživanja.

Istraživanja na razvoju multienzimskog pripravka zahvaćala su nekoliko znanstvenih područja koja se mogu podijeliti na područje pripreme enzima i područje njihove primjene. U prvom razdoblju odabrani su sojevi za proizvodnju  $\beta$ -glukanaze (*Aspergillus niger*),  $\alpha$ -amilaze i proteinaze (*Bacillus subtilis*). S odabranim sojevima razvijani su postupci biosinteze enzima, njihovo izdvajanje iz fermentirane podloge, prevođenje u kruti oblik te njihova stabilizacija. Dobiveni pripravci enzima upotrebljeni su za proučavanje fizikalno-biokemijskih svojstava i kinetike razgradnje kompleksnih prirodnih supstrata (ječam, kukuruz). Na temelju nađenih kinetičkih zakonitosti postavljen je matematički model razgradnje bjelančevina u heterogenim sustavima s obzirom na agregatno stanje i kemijski sastav na modelu hidrolize ječmene prekrupe mikrobnom proteinazom i  $\alpha$ -amilazom. Također je izučavana kooperativnost hidrolitičkih enzima pri razgradnji žitarica, što je vrlo značajno za konverziju hrane u tovu životinja.

Polazeći od navedenih istraživačkih spoznaja o djelovanju i karakteristikama pojedinih enzima provedeni su pokusi hranidbe životinja. Na osnovi dobivenih rezultata ustanovljena je optimalna formulacija multienzimskog pripravka. Priređene su podloge za osiguranje kakvoće proizvoda.

Za provedbu ovako opsežnih istraživanja potrebni su značajni kadrovski i tehnički resursi te dobro organiziran znanstveno-istraživački rad. Pliva je ispunjavala ove pretpostavke s obzirom da je organizirani istraživački rad utemeljen još 1936. godine. Infrastruktura za razvoj biotehnoloških proizvoda značajno se razvija nakon usvajanja proizvodnje antibiotika i vitamina C 1961. godine. Proizvodnja industrijskih enzima usvojena je 1981. godine.

---

Dr. Ivan Marković, mr. Branka Marković-Devčić, mr. Ivan Groš, mr. Lina Bačar-Huskić, mr. Nenad Vranešić, dipl. ing. Tomislav Horvat, PLIVA d.d., Istraživački institut, Prilaz baruna Filipovića 25, 10000 Zagreb, Hrvatska. Dipl. ing. Branko Stuburić, PLIVA d.d., Program veterine i agrara, Kalinovica, 10436 Rakov potok, Hrvatska.

## UVOD

Enzimi su biokatalizatori bjelančevinaste građe koji ubrzavaju kemijske reakcije a da se pri tome sami ne mijenjaju jer ne ulaze u sastav spojeva. U suvremenom tovu životinja nastoji se postići što veća ekonomičnost i kakvoća mesa, što se može ostvariti stabilnim zdravstvenim stanjem životinja i povećanjem njihove probavne sposobnosti. Dodatkom enzima krmnim smjesama ubrzava se razgradnja bjelančevina, staničnih stijenki biljaka i specifičnih polisaharida. Oni također razgrađuju takozvane antinutritivne tvari i nutritivno stresne čimbenike. Takvim djelovanjem enzimi neizravno utječu na zdravlje životinja, konverziju hrane i njihov prirast.

Da bi se postigli navedeni učinci potrebno je odabrati odgovarajuće enzime, usvojiti njihovu proizvodnju i razraditi način primjene, što uključuje vrlo opsežna interdisciplinarna istraživanja. Za uspješnu provedbu svih faza istraživanja i razvoja proizvoda potrebni su značajni kadrovi i tehnički resursi te dobro organiziran znanstveno-istraživački rad. Pliva je posjedovala ove pretpostavke s obzirom da tradicija bioloških istraživanja (ispitivanje lijekova na životinjama) vjerojatno datira od samog početka rada (1921.). Organizirani znanstveno-istraživački rad utemeljen je 1936. godine. Infrastruktura za razvoj bioloških proizvoda značajno se razvija nakon usvajanja proizvodnje antibiotika i vitamina C 1961. godine. Proizvodnja industrijskih enzima usvojena je 1981. godine.

U ovom pregledu prikazana su znanstveno-stručna istraživanja koja su dovela do razvoja multitenzimskog pripravka za hranidbu životinja ( $\beta$ -glukanaza,  $\alpha$ -amilaza, alkalna proteinaza). Razmatraju se također novi znanstveni pristupi koji bi mogli dovesti do poboljšanja postupka proizvodnje te kakvoće učinkovitosti pripravka u primjeni.

## PROIZVODNJA ENZIMA

### *Povijest enzima u Plivi*

Prva praktična iskustva u Plivi da pojedini mikroorganizmi prilikom uzgoja uzlučuju hidrolitičke enzime vezana su uz istraživanja biosinteze antibiotika. Pošto je 1961. godine usvojena proizvodnja oksitetraciklina nastavljena su istraživanja radi mogućeg unapređenja procesa. Tako je

Bošnjak (1961.) studirajući biosintezu oksitetraciklina našao da viskoznost hranjive podloge odmah po naciepljivanju s proizvodnim mikroorganizmom naglo pada zbog enzimske hidrolize škroba. U svezi s tim je uočeno da je jedan od mogućih načina za unapređenje ekonomičnosti procesa korištenje nusproizvoda nastalih pri biosintezi. Imajući to u vidu proučavano je nakupljanje proteaza iz *Streptomyces sp.* tijekom biosinteze. Nađeno je da tijekom šaržnog procesa biosinteze oksitetraciklina pomoću vrsta *Streptomyces*, proteaze nastaju proporcionalno količini nastalog oksitetraciklina (Bošnjak i Gamulin, 1972.). Također je proučavan proces nakupljanja  $\alpha$ -amilaze tijekom proizvodnje antibiotika te njezin utjecaj na brzinu rasta mikroorganizama i biosintezu oksitetraciklina (Stroj i sur., 1984.).

Količine enzima dobivene kao nusproizvod pri proizvodnji antibiotika su ograničene. S druge strane uočavajući svjetski trend rastuće primjene mikrobnih enzima u različitim industrijskim procesima (industrija škroba, pivarstvo, proizvodnja alkohola, prehrambena industrija i dr.) nametnula se je potreba istraživanja proizvodnje enzima kao zasebnih procesa (Šuput i Vlašić, 1965.). Treba istaknuti da su se ova istraživanja provodila uz vrlo živu suradnju sa Zavodom za industrijsku mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Zagrebu, Biotehnološki odjel, koji je predvodila prof. dr. Vera Johanides. Za tehnološki postupak proizvodnje proteolitičkih enzima mr. Drago Vlašić i dipl. ing. Mladen Vrana dobili su 1970. godine Nagradu grada Zagreba. Osim hidrolitičkih enzima, istraživane su i druge skupine kao što su glukoza izomeraza, enzimi za dijagnostiku (glukoza oksidaza, peroksidaza) kao i enzimi za farmaceutsku primjenu (kolagenaza).

### *Odabir i oplemenjivanje proizvodnih sojeva*

Prvi korak pri istraživanju proizvodnje enzima je odabir prikladnog mikroorganizma. Stoga se može reći da se istraživanja odabira sojeva za proizvodnju hidrolitičkih enzima poklapaju sa samim počecima istraživanja proizvodnje enzima (D. Vlašić, M. Vrana, J. Beljak). Za razvoj multitenzimskog pripravka za hranidbu životinja bila su značajna istraživanja na odabiru mikroorganizama proizvođača amilaza, celulaza, hemicelulaza i pro-

teinaza. Potencijalni mikroorganizmi za proizvodnju hidrolitičkih enzima izolirani su iz njihovih prirodnih staništa, a također su istraživani sojevi iz Zbirke mikroorganizama Istraživačkog instituta Plive (Groš, 1993.).

Proizvodni mikroorganizam za industrijsku primjenu mora zadovoljavati niz zahtjeva. U prvom redu mora davati visoke prinose odgovarajućeg proizvoda, poželjan je dobar rast na odgovarajućim industrijskim podlogama, mora biti stabilan, djelotvoran u pretvorbi supstrata u proizvod i dr.

Primjer poboljšanja proizvodnih sojeva primjenom genetskih metoda obrade mikroorganizama mutagenima je priprema asporogenih sojeva za proizvodnju  $\alpha$ -amilaze i alkalne proteinaze. Naime, kod primjene sporogenih proizvodnih mikroorganizama u proizvodnji enzima, fermentirana komina obično sadrži znatan broj spora otpornih na toplinu. Za dobivanje konačnog proizvoda bez proizvodnog organizma može se primijeniti sterilna filtracija. Međutim, ova tehnološka operacija može se izbjeći primjenom asporogenog proizvodnog mikroorganizma. Proučavanje specifičnih operona uključenih u regulaciju formiranja spora kod bakterije *Bacillus subtilis* (Hranueli i sur., 1974.) poslužilo je kao osnova pri izolaciji asporogenih proizvodnih sojeva. Odabrani mutanti, osim što tijekom uzgoja nisu formirali spore, imali su veću maksimalnu specifičnu brzinu rasta a maksimalni relativni prinosi enzima bili su 30-50% viši od prinosa njihovih sporogenih roditelja (Hranueli i sur., 1987.).

Neke industrijski značajne filamentozne gljive sadrže viruse koji mogu imati industrijsku primjenu. Stoga je istražen utjecaj mikrovirusa na rast gljive *Aspergillus niger* i biosintezu glukoamilaze (Valinger i sur., 1981.). U zadnje se vrijeme pokušava tehnologijom rekombinantne DNA (genetskom tehnologijom) dobiti sojeve koji bi prilikom uzgoja davali povećane prinose enzima (Pigac, 1977.).

### Svojstva enzima

Već u postupku odabira proizvodnih mikroorganizama potrebno je istražiti osnovna svojstva. Naime, pri izboru analitičkih metoda i uvjeta analize potrebno je poznavati temperaturni i pH optimum kao i stabilnost enzima pri različitim uvjetima. S

obzirom na primjenu enzima potrebno je poznavati kinetičke konstante ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ), da li se javlja inhibicija supstratom ili produktima reakcije i dr. U slučaju da bilo koji od navedenih parametara ne zadovoljava određenu svrhu nastavlja se s odabirom mikroorganizama sve dok se ne dobiju odgovarajuća svojstva enzima.

Za razvoj tehnoloških postupaka potrebno je poznavati biokemijsku strukturu enzima tj. veličinu molekule, da li je glikoprotein ili nema ugljikohidratne komponente, značajke aktivnog centra i dr.

Svojstva alkalne proteinaze (*B. subtilis*), komponente multienzimskog pripravka, temeljito su istražena. Provedena je izolacija i sistematizacija enzima po osnovi fizikalno-biokemijskih konstanti i kinetičkih parametara. Nađeno je da enzim pripada skupini bacilopeptidaza A (Deponte i sur., 1974.; Kobrehel i sur., 1974.; Vitale i Gamulin, 1975.). Molekulska masa alkalne proteinaze je između 19.000 i 20.000 daltona, a određeni aminokiselinski sastav gotovo je istovjetan sa sastavom alkalne proteinaze u literaturi opisane pod nazivom "Carlsberg"-subtilizin (Deponte i sur., 1977.). Gamulin, (1975.) je istraživao proces autolize alkalnih proteaza. Utvrđeno je da se pH profil autolize poklapa s pH profilom proteolitičke aktivnosti.

Istraživanje svojstava  $\alpha$ -amilaze (*B. subtilis*) bila su usmjerena na utjecaj temperature i pH vrijednosti te iona  $Ca^{+2}$  i  $Na^+$  na stabilnost enzima. Pri uvjetima analitičkog testa enzim ima optimalno djelovanje pri pH 5,0-6,5 i u području temperatura 60-70°C (Beljak i sur., 1980.) Za razgradnju topljivog škroba procijenjena je energija aktivacije 16.362 J/mol (Marković, 1984.). Neka svojstva  $\alpha$ -amilaze istražena su s obzirom na njezinu primjenu u pojedinim procesima (npr. pri razgradnji ječma) što je prikazano u poglavlju "Primjena enzima".

Kod  $\beta$ -glukanaze, treba istaknuti, da se za razliku od proteinaze i  $\alpha$ -amilaze radi o enzimskom kompleksu. Naime, 1,3; 1,4- $\beta$ -D- glukan i celulozu (1,4- $\beta$ -D-glukan) razrađuje više endo- i egzo-glukanaza, a u reakciji oslobođenu celobiozu razrađuje  $\beta$ -glukanaza. Enzimski kompleks  $\beta$ -glukanaza (*A. Niger*) pokazuje optimalnu aktivnost u području pH 4,5-5,5 i temperature 55-60°C (pri pH 5,0). Također je istražena temperaturna stabilnost

enzimskog kompleksa (Marković i Marković-Devčić, 1987; Marković i sur., 1988a; Marković i sur., 1989.) Elektroforezom je utvrđeno da se najviše bjelanjčevina pripravka  $\beta$ -glukanaze nalazi u dvije vrpce s molekularnim masama 33.100 i 36.600 daltona (Hudina-Domladovec i sur., 1996.)

Treba istaknuti da je u postupku izolacije i odabira mikroorganizama proizvođača  $\beta$ -glukanaze izoliran soj iz roda *Polyporus* koji je pokazivao zanimljiva fizikalno-biokemijska svojstva. Naime, dok  $\beta$ -glukanaze gljiva imaju pH-optimum u kiselom području,  $\beta$ -glukanaza *Polyporus sp.* ima najveću aktivnost pri pH 7,0 što je inače karakteristično za bakterijske  $\beta$ -glukanaze. Osim toga  $\beta$ -glukanaze iz *Polyporus sp.* ima više izražen "endo" tip razgradnje  $\beta$ -glukana nego  $\beta$ -glukanaze *A. niger* ili *B. subtilis* (Marković i sur., 1991.)

#### *Biosinteza, izdvajanje enzima i proizvodnja enzimskih pripravaka*

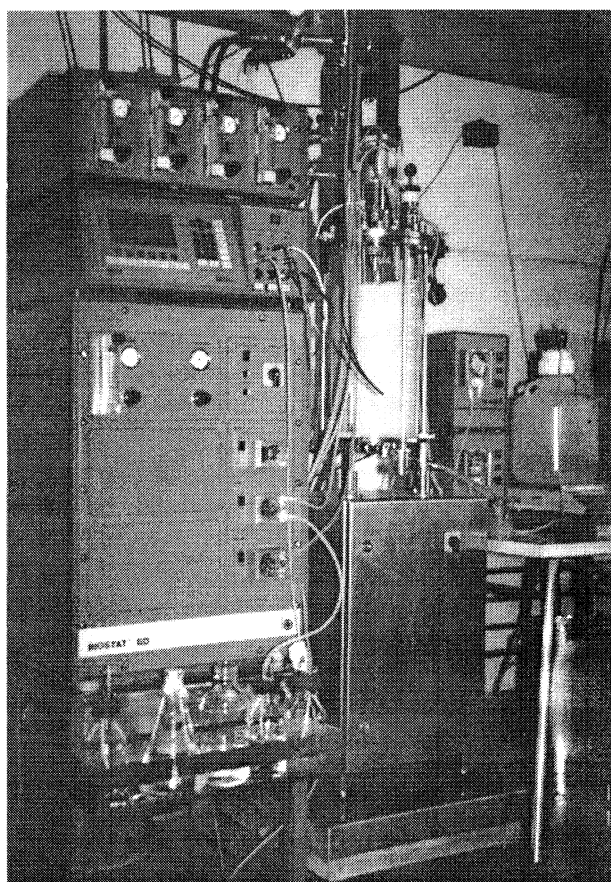
Za usvajanje biosinteze enzima potrebno je poznavati metaboličke procese, zakonitosti rasta te mehanizme i kinetiku biosinteze enzima tijekom uzgoja proizvodnog mikroorganizma. U užu izbor za nastavak istraživanja biosinteze enzima uzimani su oni mikroorganizmi koji su zadovoljavali zakonsku regulativu (Beljak, 1993.), koji su imali zadovoljavajuću produktivnost te svojstva enzima koja odgovaraju za pretpostavljenu primjenu. Istraživanja biosinteze provođena su dubinskim uzgojem proizvodnih mikroorganizama na hranjivim podlogama u laboratorijskim bioreaktorima volumena 2-10 litara (slika 1). Nakon laboratorijskih istraživanja nastavljena su istraživanja u poluindustrijskom mjerilu.

Pri razvoju postupka za proizvodnju enzima bilo je potrebno riješiti niz problema kao što su izbor hranjive podloge, utjecaj areacije na biosintezu, izdvajanje enzima iz hranjive podloge, stabilnost enzima i dr.

Optimalni uvjeti biosinteze utvrđivani su pomoću matematičkih modela (Bošnjak, 1982; Pavlović i sur., 1995.) ili postupkom planiranja pokusa čiji je primjer metoda grčko-latinskog kvadrata (Gaal i Bošnjak, 1983). Gomerčić (1982) je proučavao utjecaj miješanja komine na brzinu prijenosa kisika i

potrošnju kisika tijekom biosinteze alkalne proteinaze. Istraživanja biosinteze enzima rezultirala su novim spoznajama, koje su istovremeno u tehnološkom smislu predstavljale napredak prema tadašnjem stanju tehnike. Stoga je zatražena zaštita postupaka pripreme proteolitičkih enzima patentima (Alajbeg, 1970.) kao i enzima s  $\beta$ -glukanaznom aktivnošću (Marković-Devčić i Marković, 1978; 1985.)

**Slika 1. Laboratorijski bioreaktor za uzgoj mikroorganizama volumena 10 litara**



(snimio: Nediljko Pavlović)

Proces izdvajanja industrijskih enzima najčešće se sastoji od jediničnih operacija filtracije, centrifugiranja, bifaznih vodenih sustava i dr. Pri tome je važno da je dotična operacija učinkovita te da se maksimalno sačuva aktivnost enzima. Interesantan je primjer poboljšanja postupka

izdvajanja alkalne proteinaze iz fermentirane podloge primjenom hidrolitičkih enzima, što je također zaštićeno patentom (Horvat i sur., 1986, i 1987.), a autori su za izum dobili Nagradu tehničke kulture Hrvatske za 1987. godinu.

Nakon izdvajanja enzima iz fermentirane podloge pristupa se proizvodnji enzimskih pripravaka. Enzimski pripravci moraju biti što stabilniji, moraju imati odgovarajuću aktivnost kako bi bili pogodni za primjenu. Naime, aktivnost mora biti tako profilirana, da se lako dozira u sustav gdje se primjenjuje. Zbog toga se enzimi pripremaju u dva osnovna oblika: tekućem i krutom. Za hranidbu životinja pogodniji su kruti enzimski pripravci. Tijekom procesa proizvodnje enzimskih pripravaka prisutna mikroba populacija mora biti pod kontrolom. Pripravak enzima ne smije sadržavati patogene mikroorganizme, a također je propisan dozvoljeni broj nepatogenih mikroorganizama. U tom smislu poduzimana su vrlo opsežna razvojna istraživanja koja su rezultirala postupcima čišćenja enzimskih otopina i postupkom za pripremu enzimskih pripravaka (Alajbeg, 1977; Alajbeg i Horvat, 1977.). Također je istražena mogućnost primjene radijacijskih metoda za smanjenje broja mikroorganizama u enzimskim pripravcima (Papić i sur., 1992.)

Tijekom čuvanja enzima dolazi do smanjenja njihove aktivnosti. Deaktivacija enzima nastupa uglavnom zbog različitih oksidativnih i litičkih procesa. Radi postizanja što veće stabilnosti enzimskih pripravaka praćene su fizikalno-biokemijske promjene pripravaka  $\beta$ -glukanaze tijekom čuvanja te je primijećeno da se najveće promjene događaju na početku razdoblja čuvanja enzima (Galić i sur., 1989.).

## PRIMJENA ENZIMA

### *Enzimska razgradnja žitarica*

Prva iskustva primjene enzima u Plivi također su sticana pri razvoju proizvodnje antibiotika. Naime, od samog početka proizvodnje antibiotika amilolitički enzimi biljnog podrijetla rabljeni su za predhidrolizu škrobne komponente hranjive podloge.

Primjena enzima veliko je i važno područje enzimskog inženjerstva. O pravilnoj primjeni enzima ovise postignuti gospodarski učinci. Tko bolje vlada znanjem za primjenu enzima ima bolje rezultate te je konkurentniji na tržištu. S motrišta primjene enzima u hranidbi životinja potrebno je prema tome poznavati mehanizme i kinetiku razgradnje škroba, celuloznih i hemiceluloznih komponenata kao i bjelančevina.

Za sticanje znanja korisnih pri izboru formulacije multienzimskog pripravka za hranidbu životinja korisna su bila istraživanja kinetike hidrolize škroba  $\alpha$ -amilazom (*B. subtilis*) proučavanje utjecaja uvjeta hidrolize kukuruznog škroba na svojstva dobivenog maltodekstrina (Marković, 1984, 1988).

Na području razgradnje celuloznih i hemiceluloznih komponenata istraživana je primjena hidrolitičkih enzima pri siliranju zelenih krmnih masa (Vranešić i sur., 1986.). Mnogi otpadni materijali poljoprivredne proizvodnje nakon fizikalne i enzimske obrade mogu se također rabiti kao kvalitetna stočna hrana. U tom smislu mogu biti vrlo korisna istraživanja enzimske razgradnje celuloze i ksilana kukuruznog oklaska (Nožinić i Dražić, 1982.). Od  $\beta$ -glukanskih komponenata žitarica posebno je interesantan 1,3; 1,4- $\beta$ -D-glukan ( $\beta$ -glukan). Ovaj polimer, za razliku od celuloze ima u svom lancu oko 30% 1,3- $\beta$ -glukozidnih vezova. Iako se  $\beta$ -glukan u zrnu ječma i pšenice pojavljuje u malim količinama (2,8-5,5%) kod primjene tih žitarica u stočnoj hrani on izaziva povećanu viskoznost u sadržaju crijeva, otežava probavu, tj. djeluje antinutritivno. Dodatkom  $\beta$ -glukanaze stočnoj hrani dolazi do razgradnje ovog polimera i eliminacije njegovog negativnog utjecaja. Radi izbora  $\beta$ -glukanaze za dodavanje stočnoj hrani proučavana je kinetika razgradnje  $\beta$ -glukana ječma  $\beta$ -glukanazama iz *A. niger*, *Polyporus sp.* i *B. subtilis*. Određena pažnja također je posvećena nastalim produktima hidrolize  $\beta$ -glukana ječma (Joveva i sur., 1985; Marković i sur., 1991.).

Za uzgoj životinja i proizvodnju kvalitetnog mesa važnu ulogu imaju bjelančevine sadržane u stočnoj hrani. Među žitaricama ječam sadrži najviše bjelančevina, pa se zbog toga često rabi kao sastavni dio krmnih smjesa. Osim toga ječam je osnovna sirovina u pivarstvu, a njegovi ostaci iz

proizvodnje (pivarski trop) se najčešće upotrebljava za hranidbu životinja. Polazeći od te činjenice u Plivi je upravo posvećena velika pažnja enzimskoj razgradnji bjelančevina.

Proučavan je utjecaj koncentracije mikrobne proteinaze i koncentracije ječma na kinetiku razgradnje bjelančevina. Nađeno je da se za uže područje uvjeta reakcije proces razgradnje može prikazati kinetikom prvog reda te je predložen matematički model razgradnje bjelančevina (Topolovec i Marković, 1979.). Međutim, visok stupanj zakonitosti dobiven je prikazom kinetičkih podataka razgradnje bjelančevina ječma u Foster-Niemannovom prikazu (Marković i sur., 1984.). Temeljem kinetičkih zakonitosti predložena je modificirana Foster-Niemannova jednadžba za razgradnju bjelančevina u heterogenim sustavima s obzirom na agregatno stanje i kemijski sastav supstrata. Jednadžba obuhvaća utjecaj koncentracije supstrata, produkata reakcije i koncentracije enzima na odvijanje reakcije. Postavljen je matematički model razgradnje bjelančevina te je dobiveno dobro slaganje s eksperimentalnim podacima (Marković i sur., 1988.b). Na osnovi matematičkog modela osim što je opisan tok enzimskog procesa moguće je vrednovanje enzima za razgradnju bjelančevina iz različitih izvora. Nadalje, u ječmu postoje inhibitori proteinaza koji usporavaju proces razgradnje bjelančevina. Primjenom predloženih kinetičkih zakonitosti moguće je također identificirati utjecaj inhibitora na odvijanje procesa enzimske razgradnje bjelančevina (Marković i sur., 1995.).

Pri razgradnji kompleksnih prirodnih supstrata kakvi se upotrebljavaju za hranidbu životinja moguće je kooperativno djelovanje različitih hidrolitičkih enzima. Kooperativno djelovanje enzima ima pozitivan učinak na konverziju hrane pri hranidbi životinja. Pri istraživanju svojstava pripravka  $\alpha$ -amilaze i poboljšanja uvjeta hidrolize ječma pokazano je da proteolitička i  $\beta$ -glukanazna aktivnost u enzimu značajno pospješuje razgradnju ječma (Marković i sur., 1987).

## HRANIDBA ŽIVOTINJA

S obzirom da su pokusi hranidbe životinja vrlo skupi i dugotrajni, poznavanje svojstava enzima te

mehanizama i kinetike razgradnje bjelančevina opisano u prethodnim poglavljima može znatno pomoći pri izboru enzima i utvrđivanju optimalnih doza u hranidbi. Međutim, najbolji se uvid u djelovanje pojedinog dodanog enzima ili enzimskog koktela na konverziju hrane može dobiti na temelju pokusa hranidbe životinja i istovremenog praćenja fiziološkog stanja životinja.

U prvim radovima istraživani je učinak dodatka enzima s nutritivnim antibiotikom stočnoj hrani na parametre u tovu životinja (Matošić-Čajavec i sur., 1984.). Kasnije su isto tako provedeni pokusi hranidbe životinja uz dodatak enzima stočnoj hrani ali nisu dodavani nutritivni antibiotici (Matošić-Čajavec i sur., 1990., 1991.). Na osnovi pokusa primjene pojedinih enzima u hranidbi životinja te uzimajući u obzir sva stečena znanja o svojstvima enzima i mehanizmima razgradnje kompleksnih prirodnih supstrata, definiran je sastav multienzimskog pripravka za hranidbu životinja. Pokusi hranidbe životinja pokazali su da je primjena ovog enzimskog pripravka gospodarski potpuno opravdana (Marković-Devčić i sur., 1995.). Na izložbi INOVA 94., Zagreb, Priredivački odbor 3. hrvatskog salona inovacija dodijelio je Zlatnu plaketu grupi autora za znanstveno-stručni rad na razvoju multienzimskog pripravka za hranidbu životinja.

## LITERATURA

1. Alajbeg, I. (1970): Postupak za pripremu proteolitičkih enzimskih preparata, Jug. pat. prijava: P-2604/70, YU 40420.
2. Alajbeg, I. (1977): Postupak za čišćenje enzimskih otopina, Jug. pat. prijava: P-2136/77, YU 40011.
3. Alajbeg, I., T. Horvat (1977): Postupak za pripremu sterilnih enzimskih preparata, Jug. pat. prijava: P-908/77.
4. Beljak, J. (1993): Prijenos tehnologije i zakonska regulativa u razvoju biotehnologije, Prehrambeno-tehnol. biotechnol. rev. 31 (2-3) 114-115.
5. Beljak, J., I. Marković, T. Horvat (1980): Informacija o produktu: Bakterijska alfa amilaza, Pliva, Zagreb.
6. Bošnjak, M. (1961): Utjecaj mješanja i aeracije na biosintezu oksitetraciklina. Magistarska rasprava, Zagreb.
7. Bošnjak, M. (1982): Matematičko modeliranje biokemijskih reakcijskih sustava, Kem. Ind. 31 (11) 545-559.

8. Bošnjak, M., S. Gamulin (1972): Biosinteza proteolitičkih enzima tokom semikontinuirane biosinteze oksitetraciklina, *Kem. Ind.* 21 (8) 397-400.
9. Deponte, R., Đ. Kobrehel, M. Vrana (1974): Izoelektrično fokusiranje alkalne proteaze *Bacillus* vrste, *Kem. Ind.* 23 (3) 169-172.
10. Deponte, R., D. Kobrehel, M. Vrana, M. Belli, M. Tomasi (1977): Molekulska težina i amino-kiselinski sastav alkalne proteaze "PLIVA-SUBTILIZIN" iz *Bacillus* sp. 83, *Kem. Ind.* 26 (9) 463-466.
11. Gaal, E., M. Bošnjak (1983): Nalaženje optimalnih uvjeta biosinteze mikrobnih metabolita primjenom postupka planiranja pokusa, *Kem. Ind.* 32 (8) 393-399.
12. Galić, Kata, I. Marković, Branka Marković-Devčić, Nada Ciković (1989): Physico- Biochemical Changes of Enzyme Complex  $\beta$ -Glucanase during Storage, *Monatsschr. Brauwiss.* 42 (3) 113-115.
13. Gamulin, S. (1975): Karakterizacija i proučavanje procesa autolize nekih alkalnih proteaza *Bacillus* vrsta. Magistarska rasprava, Zagreb.
14. Gomerčić, K. (1982): Utjecaj brzine prijenosa kisika na kinetiku rasta bakterijskih populacija i biosintezu mikrobnih metabolita. Magistarska rasprava, Zagreb.
15. Groš, I. (1993): Zbirke mikroorganizama, *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev.* 31 (2-3) 101.
16. Horvat, T., B. Prester, M. Vrana, M. Bošnjak, I. Groš, M. Borščak (1986): Postupak za dobivanje alkalne proteinaze iz fermentiranih podloga, *Jug. pat. prijava: P-1997/86.*
17. Horvat, T., M. Vrana, M. Bošnjak, B. Prester, Suzana Joveva (1987): Enzymatic Treatment of Fermentation Broth in Downstream Processing Improvement of Alkaline Proteinase Production. *Proc. 4th European Congress on Biotechnology, Volumen 2, O. M. Neijssel, R. R. van der Meer, K. Ch. A. M. Luyben (Eds.), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.*
18. Hranueli, D., M. Bošnjak, M. Filipović, T. Horvat, M. Vrana (1987): Asporogenic Mutants of *Bacilli*: Isolation, Characterization and their Industrial Application, *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev.* 25 (4) 119-126.
19. Hranueli, D., P. J. Piggot, J. Mandelstam (1974): Statistical Estimate of the Total Number of Operons Specific for *Bacillus subtilis* Sporulation, *J. Bacteriol.* 119 (3) 684-690.
20. Hudina-Domladovec, Marijana, B. Mildner, I. Marković (1996). Neobjavljeni rezultati.
21. Joveva, Suzana, Branka Marković-Devčić, I. Marković (1985): Razdvajanje glukoze, celobioze i laminaribioze u hidrolizatu  $\beta$ -glukana ječma tankoslojnom kromatografijom, *Prehrambeno-tehnol. rev.* 23 (4) 149-152.
22. Kobrehel, Đ., R. Deponte, M. Vrana (1974): Izolacija i sistematizacija alkalne proteaze iz *Bacillus* sp. 83 na osnovi fizikalno-kemijskih konstanti i kinetičkih parametara hidrolize nekih estera, *Kem. Ind.* 23 (4) 219-223.
23. Marković, I. (1984): Kinetika hidrolize škroba preparatom bakterijske alfa-amilaze, *Kem. Ind.* 33 (3) 125-130.
24. Marković, I. (1988): Utjecaj uvjeta hidrolize škroba bakterijskom  $\alpha$ -amilazom na svojstva maltodekstrina, *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev.* 26 (1-2) 43-48.
25. Marković, I., R. Deponte, V. Marić, Vera Johanides (1995): Enzymic Hydrolysis of Protein during Barley Spent Grains Mashing, *Process Biochem.* 30 (5) 411-419.
26. Marković, I., B. Gauš, Z. Mikulić (1987): Svojstva preparata bakterijske  $\alpha$ -amilaze namijenjenog za primjenu u pivarstvu, *Pivarstvo* 20 (3) 123-129.
27. Marković, I., Branka Marković-Devčić (1987): Enzim  $\beta$ -glukanaza, *Praxis vet.* 36 (1) 29-39.
28. Marković, I., Branka Marković-Devčić, Suzana Joveva (1991): Some Physico-biochemical Properties of  $\beta$ -Glucanase from *Polyporus* sp., *Monatsschr. Brauwiss.* 44 (9) 3 t 2-3 17
29. Marković, I., Branka Marković-Devčić, Ivanka Sorić (1988a): Karakteristike Betanaze 150 i primjena u pivarstvu. *Enzimi Pliva: Referati s II sastanka stručnjaka industrije piva i Plive, Pliva, Zagreb.*
30. Marković, I., Branka Marković-Devčić, Ivanka Sorić, Stojanka Radeka (1989): Svojstva i primjena fungalne  $\beta$ -glukanaze u pivarstvu, *Pivarstvo* 22 (2) 79-85.
31. Marković, I., V. Topolovec, V. Marić, Vera Johanides (1984): The Barley Protein Degradation: Effect of Neutral Proteinase Concentration on Protein Degradation Kinetics, *J. Inst. Brew.* 90 (1) 7-12.
32. Marković, I., V. Topolovec, V. Marić, Vera Johanides (1988b): The Barley Protein Degradation: Mechanism of Protein Solubilization during Barley Mashing with Neutral Proteinase, *Biotechnol. Bioeng.* 32 (1) 18-27.
33. Marković-Devčić, Branka, S. Bogdan, I. Groš, N. Vranešić, Lina Bačar-Huskić, B. Prester, T. Horvat, I. Marković, I. Friganović, B. Stuburić (1995): Multienzymatic Preparation for Animal Nutrition, *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev.* 33 (2-3) 123-126.

34. Marković-Devčić, Branka, I. Marković (1978): Postupak za pripravu enzima s celulaznom i  $\beta$ -glukanaznom aktivnošću, Jug. pat. prijava: P-2104/78, YU 41120.
35. Marković-Devčić, Branka, I. Marković (1985): Postupak za pripravu enzima  $\beta$ -glukanaze, Jug. pat. prijava: P-2029/85, YU 44537.
36. Matošić-Čajavec, Vera, D. Mikačić, E. Gaal (1984): Istraživanje učinka kombinacije nutritivnog antibiotika i kisele proteaze u tovu pilića smjesama s neadekvatnom razinom proteina, Krmiva 26, 263-267.
37. Matošić-Čajavec, Vera, D. Mikačić, I. Marković, Branka Marković-Devčić, Mira Krsmanović (1990): A Contribution to the Possibilities of Barley Nutritive Value Improvement by the Addition of beta-Glucanase Enzyme, Praxis vet. 38 (2) 111-116.
38. Matošić-Čajavec, Vera, D. Mikačić, M. Vrana, E. Gaal, Mira Krsmanović, I. Marković, Branka Marković-Devčić (1991): Enzymes in Pig Nutrition, Praxis vet. 39 (1) 113-117.
39. Nožinić, Ranka, Mensura Dražić (1982): Fermentable Sugars from Agricultural Waste Materials, Biotechnol. Lett. 4 (2) 109-114.
40. Papić, Jasminka, V. Mihoković, J. Beljak, D. Ražem (1992): Radiation Decontamination of Microbial  $\alpha$ -Amylase, Prehrambeno-tehnol. biotechnol. rev. 30 (4) 177-182.
41. Pavlović, N., Ljubica Matijašević, Đurđa Vasić-Rački (1995): Primjena impulsne pobude u kemijskom inženjerstvu, Kem. Ind. 44 (2) 57-70.
42. Pigac, J. (1997): Usmeno priopćenje.
43. Stroj, A., M. Bošnjak, S. Turina, Vera Johanides (1984): Kinetics of Amylase Accumulation and Carbohydrates Uptake during the Process of Antibiotic Production; Third European Congress on Biotechnology, Vol. I; Verlag Chemie, Weinheim, 123-128.
44. Šuput, Jelena, D. Vlašić (1965): Proizvodnja mikrobnih enzima i njihova primjena, Farm. Glas. 21, 253-258.
45. Topolovec, V., I. Marković (1979): Primjena kompjutera u modeliranju i simulaciji procesa razgradnje proteina. Informatica 79, Slovensko društvo informatika, Ljubljana.
46. Valinger, R., J. Beljak, M. Bošnjak, M. Čurčić, Ljubinka Vitale (1981): Kinetics of Virus Replication and Glucoamylase Biosynthesis in *Aspergillus niger* Repeated Fed-Batch Culture, Adv. Biotechnology 1, 229-234.
47. Vitale, Ljubinka, S. Gamulin (1975): Characterization of Subtilisins by Isoelectric Focusing and Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Int. J. Biochem. 6, 165-171.
48. Vranešić, N., Mensura Dražić, Ranka Nožinić, J. Beljak, T. Horvat, M. Knežević (1986): Konzerviranje zelenih krmnih masa siliranjem uz dodatak enzima, Prehrambeno-tehnol. biotechnol. rev. 24, 43-46.

## SUMMARY

The main reason for enzyme use in animal nutrition is better economy and quality of the produced meat. To achieve this it is necessary to select corresponding hydrolytic enzymes, to adopt their production and to develop the procedure of their use for which very extensive interdisciplinary research is needed.

The research on the multienzymatic preparation development spread over several scientific fields which can be divided into enzyme production and enzyme use. In the first phase strains were chosen for  $\beta$ -glucanase (*Aspergillus niger*),  $\alpha$ -amylase and proteinase (*Bacillus subtilis*) production. Using the selected strains, the procedures for enzyme biosynthesis, isolation from fermentation broth, stabilization and production the enzymes in solid form were developed. Produced enzyme preparations were used in the studies of physico-biochemical characteristics. Kinetics of complex nature substrate (barley, maize) degradation were examined. Based on estimated kinetic laws, the mathematical model of protein hydrolysis in heterogeneous systems in respect to aggregate state and chemical composition using the barley grits hydrolysis with microbial proteinase and  $\alpha$ -amylase was proposed. Furthermore, the cooperativity of hydrolytic



enzymes in cereal hydrolysis, very important for feed conversion in animal nutrition, was also studied.

Based on the mentioned results of research on enzyme characteristics and their action on complex substrate the animal nutrition experiments were performed. Following the achieved results the optimal formulation of multienzymatic preparation was stated. Besides, the procedure for quality assurance were proposed.

Such extensive research requires highly skilled professional and technical resources as well as organized scientific work. These suppositions were fulfilled when organized research in Pliva was established 1936. The infrastructure for biotechnological production developed significantly after the adoption of antibiotic and vitamin C manufacture in 1961. In 1981 the production of industrial enzymes was adopted.



## MJEŠAONA STOČNE HRANE

# KUŠIĆ PROMET

**Psarjevo donje 61, 10380 Sv. Ivan Zelina, tel/fax: 01/869-202**

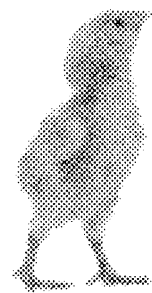
Proizvodi potpune i dopunske krmne smjese za sve vrste i kategorije životinja:

- perad
- svinje
- preživače

Vrši promet domaćih i uvoznih sirovina za proizvodnju stočne hrane: žitarica, uljnih sačmi, fosfata, ribljeg i mesnog brašna i stočnog brašna

# ZA USPJEŠNO PREVENIRANJE KOKCIDIOZE

**AVATEC®**  
**CYGRO®**  
**CYCOSTAT®**



**HOFFMANN - LA ROCHE** povećao je paletu antikokcidijskih pripravaka uz dosadašnji

**AVATEC®** (Lasalocid) dvovalentni ionofor s dozom od 75 do 125 mg/kg krmne smjese za piliće u tovu, puriće, fazančiće, jarebice, uzgojni podmladak za kokoši

na

**CYGRO®** (Maduramicin) monovalentni ionofor koji se daje u količini 5 mg/kg krmne smjese za piliće u tovu, puriće i uzgojni podmladak za kokoši i djelotvoran je u potpunim rotacijskim i shuttle programima

i na

**CYCOSTAT®** (Robenidine) kemijsko antikokcidijsko sredstvo za brojlere, puriće, rasplodni podmladak kokoši u dozi od 33 mg/kg krmne smjese, te za kuniće u dozi od 66 mg/kg krmne smjese. Posebno je djelotvoran u prvom razdoblju shuttle programa za brojlere.

**AVATEC®**, **CYGRO®** i **CYCOSTAT®** su granulirani proizvodi za optimalno umješavanje u krmne smjese.

Proizvodi:



HOFFMANN-LA ROCHE Ltd.  
CH-4070 Basel, Switzerland

Distributer za Hrvatsku i Sloveniju:



**AGROVIT d.o.o.**  
Frankovičeva ulica 1  
2250 PTUJ, SLOVENIJA  
Tel: +386 62 78 66 70  
Fax: +386 62 78 66 71