

4. Kleymenov N.I., Magomedov M.Sh., Venediktov A.M. Mineralnoe питание skota na kompleksakh i fermakh. – M.: Rosselkhozizdat, 1987. – 191 s.

5. Mysik A.T., Efendiev B.Sh., Ulmbashev M.B. Prirodnye kormovye resursy raznykh ekologicheskikh zon Tsentralnogo Predkavkazya (obzor) // Zootekhniya. – 2017. – № 6. – S. 21-25.

6. Pchel'nikov D. Kompleks mikroelementov dlya KRS // Kombikorma. – 2009. – № 7. – S. 71.

7. Efendiev B.Sh., Bodyako K.R. Vliyanie zimnego ratsiona, sbalansirovannogo po makro- i mikroelementam, na obmennye protsessy organizma doynnykh korov // Tr. Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2011. – № 2 (29). – S. 160-163.

8. Yarmots L., Petrova Yu. Effektivnost ispolzovaniya mineralnogo premiksa v ratsionakh sukhostoynykh korov // Glavnyy zootehnik. – 2012. – № 3. – S. 25-27.

Работа выполнена по ГРТИ 68.39.15.



УДК 664.121

Н.В. Донкова, С.А. Донков, А.И. Афанасьева
N.V. Donkova, S.A. Donkov, A.I. Afanasyeva

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕГКОУСВОЯЕМЫХ САХАРОВ ИЗ ЗЕРНА ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА

BIOTECHNOLOGY OF OBTAINING EASILY DIGESTED SUGARS FROM GRAIN FOR ANIMAL BREEDING INDUSTRY

Ключевые слова: животноводство, биотехнология, амилолитические микроорганизмы, сахара, зерно.

Keywords: animal breeding industry, biotechnology, amylolytic microorganisms, sugars, grain.

Разработана биотехнология получения сахаров (патоки) из экструдированной зерновой смеси с использованием амилолитических микроорганизмов. В качестве зернового сырья использовали зерновую смесь (пшеница + овёс). Ферментативный гидролиз крахмала осуществляли смесью штаммов микроорганизма *Bacillus subtilis*: № 2 – amylolytic, № 9 – amylolytic и № 12 – amylolytic. Установлено, что на питательной среде полный цикл развития исследуемых микроорганизмов завершается за 24 ч. Вначале споры созревают, увеличиваются в размерах, приобретают яйцевидную форму, через 12 ч прорастают и разжижают крахмальный клейстер, через 14 ч у палочки формируется гранулеза, через 18 ч спора на конце палочки исчезает, а макронуклеус вместе с гранулезой расходятся к противоположным концам палочки, через 20 ч у дочерних палочек появляется спора, через 24 ч палочка исчезает. Гидролизат, полученный методом ферментирования полисахаров зернового сырья с использованием амилолитических микроорганизмов, имеет густую консистенцию, коричневый цвет и сладкий вкус. 1 л гидролизата после упаривания весил 1 кг 250 г. Количество общего сахара в гидролизате составило 24,22%, а в пересчёте на сухое вещество – 68,28%; белка – 2,28%, а в пересчёте на сухое вещество – 6,41%. Препарат обладает большой энергетической ценностью, 1 кг препарата содержит больше одной кормовой единицы. Установленная способность амилолитических штаммов микроорганизмов *Bacillus subtilis* осахаривать зерновые смеси может применяться в животноводстве с целью ликвидации дефицита углеводов в организме сельскохозяйственных животных. Экспериментальные образцы патоки не токсичны и обладают высокой энергетической ценностью. Технология рекомендуется для получения патоки в промышленных объемах.

The biotechnology of the production of sugars (molasses) of extruded grain mixture with the use of amylolytic microorganisms has been developed. The grain mixture of wheat and oat was used as the grain raw material. Enzymatic hydrolysis of starch was performed by the mixture of the strains of *Bacillus subtilis*: No. 2 – amylolytic, No. 9 – amylolytic and No. 12 – amylolytic. It has been found that on the culture medium, the complete development cycle of the studied microorganisms is completed in 24 hours. Initially, the spores mature, increase in size, take on ovoid form; in 12 hours they swell and liquefy starch paste; in 14 hours, the rod bacterium forms granulosa cell; in 18 hours, the spore at the end of the rod bacterium disappears, and the macronucleus with granulosa cell move to the opposite ends of the rod bacterium; in 20 hours, spores appear in the daughter rod bacteria; in 24 hours, the rod bacterium disappears. The hydrolysate obtained by the fermentation of the polysugars of the grain raw material through the use of amylolytic microorganisms is of thick consistency, brown color and sweet taste. One liter of the hydrolysate after evaporation weighed 1 kg and 250 grams. Total sugar content in the hydrolysate amounted to 24.22%, and on a dry basis – 68.28%; protein content – 2.28%, and on a dry basis – 6.41%. This product is of high energy content, and one kilogram of the product contains more than one fodder unit. The revealed ability of amylolytic strains of microorganisms *Bacillus subtilis* to saccharify grain mixes may be used in animal farming to overcome the shortage of carbohydrates in the body of farm animals. Experimental molasses samples are non-toxic and have a high energy value. The technology is advised for obtaining molasses in industrial-scale volumes.

Донкова Наталья Владимировна, д.в.н., проф., Красноярский государственный аграрный университет. E-mail: dnv-23@mail.ru.

Донков Сергей Александрович, к.б.н., доцент, Красноярский государственный аграрный университет. E-mail: dnv-23@mail.ru.

Афанасьева Антонина Ивановна, д.б.н., проф., декан биолого-технологического фак-та, Алтайский государственный аграрный университет. E-mail: antonina59-09@mail.ru.

Donkova Natalya Vladimirovna, Dr. Vet. Sci., Prof., Krasnoyarsk State Agricultural University. E-mail: dnv-23@mail.ru.

Donkov Sergey Aleksandrovich, Cand. Bio. Sci., Assoc. Prof., Krasnoyarsk State Agricultural University. E-mail: dnv-23@mail.ru.

Afanasyeva Antonina Ivanovna, Dr. Bio. Sci., Prof., Dean, Bio-Technologic Dept., Head, Chair of General Animal Biology, Physiology and Morphology, Altai State Agricultural University. E-mail: antonina59-09@mail.ru.

Введение

Зерно злаковых растений широко используется в кормлении сельскохозяйственных животных. В различных видах и сортах зерновых растений содержится от 50 до 70% крахмала [1, 2].

Процесс расщепления крахмала до глюкозы в желудочно-кишечном тракте животных является высокоэнергетическим, поэтому целесообразнее сначала получать из зерна легкоусвояемые сахара и затем включать их в рацион животных. Сущность процесса заключается в ферментативном гидролизе крахмала под действием амилолитических ферментов, вырабатываемых пищеварительными железами и собственно микроорганизмами.

Ферменты микробиологического происхождения широко используются в животноводстве для получения легкоусвояемых сахаров из крахмала. Процесс переработки состоит из механической подготовки зерна в кавитаторе или экструдере и ферментативного гидролиза крахмала [1-3]. Использование амилолитических микроорганизмов в гидролизе крахмала является альтернативной технологией микробиологической биоконверсии, при этом сырье для производства кормовой добавки проходит обработку в среде, аналогичной микрофлоре рубца и начального участка пищеварительного тракта [4], то есть первый этап пищеварения – подготовка корма к перевариванию начинается вне организма. Отсутствующие в пищеварительном тракте животного ферменты компенсируются ферментами микроорганизмов. Поэтому процесс переваривания таких кормов непосредственно в кишечнике животных характеризуется высоким уровнем биологических процессов и переваримостью корма, а также сниженными ферментными и энергетическими затратами организма на всех этапах пищеварения. Полностью исключается необходимость запаривания или увлажнения кормов перед скармливанием. Кроме того, культивируемые амилолитические микроор-

ганизмы, предназначенные для кормовых и лечебно-профилактических целей [5], представляют интерес по двум причинам. Во-первых, они растут очень быстро: время удвоения численности микроорганизмов измеряется часами или даже минутами. Во-вторых, в зависимости от выращиваемых микробов в качестве субстратов для питательных сред могут использоваться разнообразные виды сырья.

Что касается субстратов, то современные технологии идут по двум главным направлениям: переработка низкокачественных бросовых продуктов или же использование легкодоступных углеводов с целью получения за их счет микробной биомассы, содержащей высококачественный белок [6, 7]. Гидролизованное микробиологическим путем зерновое сырье является хорошей питательной средой для культивирования микроорганизмов, относящихся к группе молочнокислых [8]. Данная группа обладает выраженными антагонистическими свойствами по отношению к микроорганизмам энтеропатогенной группы (кишечная палочка, синегнойная палочка, протей, клебсиелла и др.). При этом культивируемые молочные микроорганизмы способны сами синтезировать ряд витаминов и биологически активных веществ. Тем самым на основе зернового сырья, подвергнутого биоконверсии, можно получать кормовые добавки, содержащие моносахара и биологически активные компоненты, обладающие лечебно-профилактическим эффектом, что особенно актуально при выращивании молодняка сельскохозяйственных животных [9, 10]. В связи с вышеизложенным проблема поиска новых альтернативных способов получения кормовых продуктов, повышающих качество исходного сырья при снижении затрат на их производство, а также разработка биотехнологических принципов переработки различных видов зерна актуальна и является одной из главных задач для ученых, работающих в агропромышленном секторе России.

Целью исследования явилась разработка биотехнологии получения легкоусвояемых сахаров из зерна с использованием культуры микроорганизмов. В **задачи** исследования входило изучение влияния стадии развития амилолитических микроорганизмов на степень осахаривания крахмала в зерне и определение биохимического состава гидролизата из зернового сырья.

Материалы и методы

Исследования проведены в 2015-2017 гг. в лаборатории Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины Красноярского ГАУ. Идентификация микроорганизмов, обладающих амилолитическими свойствами, из представленного нами материала, проведена в ФГУП ГосНИИ-генетика (г. Москва). Каждому штамму присвоен номер и дано название: *Bacillus subtilis* № 2-amyloplitic, *Bacillus subtilis* №9-amyloplitic и *Bacillus subtilis* №12-amyloplitic. Штаммы приняты на национальное патентное депонирование во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

В качестве зернового сырья использовали зерновую смесь (пшеница+овёс). Смесь заливали водой, доводили до кипения, остужали до $t=75^{\circ}\text{C}$ и добавляли споры амилолитических микроорганизмов. Ферментативный гидролиз крахмала осуществляли при помощи смеси штаммов микроорганизма *Bacillus subtilis*: № 2 – amylolytic, № 9 – amylolytic и № 12 – amylolytic. Гидролиз сырья проводили в термостате при температуре 40°C в течение одних суток. Степень осахаривания крахмала контролировали по наличию цветной реакции с 0,02н водным раствором йода и раствором Люголя. Определение биохимического состава гидролизата проводили в научно-исследовательском испытательном центре по контролю качества сельскохозяйственного сырья и пищевых продуктов при Красноярском государственном аграрном университете, определение токсичности продукта – в испытательной лаборатории Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Красноярск). Микроскопию и фотографирование изучаемого материала – при помощи микроскопа МИКМЕД-6 с тринокулярной насадкой и цифрового фотоаппарата Canon-A520, имеющего программное обеспечение для компьютерной обработки получаемых изображений. Статистический анализ полученных

данных – при помощи математических функций в электронных таблицах Ms.Excel.

Результаты исследований и их обсуждение

В результате изучения цикла развития амилолитических бактерий установлено, что при попадании спор на питательную среду они претерпевали ряд последовательных преобразований. Происходило созревание спор, они увеличивались в размерах, приобретали яйцевидную форму, при окрашивании раствором Люголя приобретали перламутровый зеленый цвет. Лаг-фаза длилась 12 ч, после чего споры со стороны более острого конца начинали прорастать, что характеризовалось появлением из споры палочки. При прорастании спор происходило выделение фермента, который разжижал крахмальный клейстер. Прорастание спор сопровождалось образованием углекислого газа и, соответственно, появлением пены на поверхности клейстера. Крахмальный клейстер становился жидким, как вода, но не прозрачным. При микроскопировании капли клейстера в нем обнаруживали короткие палочки, по форме напоминающие сигары с терминальным расположением споры. Осахаривание крахмала происходило в течение второй половины суток от момента внесения в него спор. В это время происходили рост и деление палочек. Через 14 ч палочки удлинялись, в них формировалась гранулеза, и по мере роста палочек в гранулезе появлялись от одного до трех разрывов. Гранулеза, представляющая крахмалоподобное вещество, хорошо окрашивалась раствором Люголя в темносиний цвет. Через 18 ч от начала культивирования спора на конце палочки исчезала, а макронуклеус вместе с гранулезой расходился от центра к противоположным концам палочки.

Далее развитие микробных клеток происходило по одному из двух путей. Одна часть клеток, лишенных споры, начинала делиться. При этом образовавшиеся дочерние клетки могли располагаться друг к другу как под углом, так и могли выстраиваться друг за другом, образуя короткие цепочки. Через 20 ч от начала опыта у дочерних палочек на одном конце палочки появлялась спора. Другая же часть палочек удлинялась, истончалась и образовывала так называемые нити, которые часто сплетались в клубки. Спор у этих палочек не появлялось.

Заканчивался цикл развития у этих двух групп палочек по-разному. У той группы палочек, у которых образовывались споры в дальнейшем, тепло палочки растворялось, и оставались только споры, а палочки, которые образовывали нити, растворялись без остатка. Исчезновение палочек происходило через 24 ч от начала культивирования. Во время своего роста и деления бактерии выделяли в окружающую среду сначала разжижающий фермент, затем осахаривающий фермент, амилоза, и амилопектин крахмала расщеплялись до молекул мальтозы и, далее, до глюкозы. При изучении динамики изменения окрашивания крахмального клейстера препаратами йода были получены следующие результаты: 0,02н водный раствор йода по мере расщепления амилозы и амилопектина до мальтозы и глюкозы изменял свою окраску следующим образом: фиолетовый, сиреневый, розовый, оранжевый, желтый и бесцветный. Раствор Люголя, соответственно, окрашивался в темно-синий, гранатовый, темно-коричневый, ржаво-коричневый, янтарно-желтый цвет. Темно-синий и фиолетовый цвета свидетельствовали о присутствии в растворе молекул крахмала; сиреневый и коричневый цвета – о наличии декстринов, а розовый, оранжевый, желтый цвета и обесцвечивание – о наличии сахаров.

Осахаривание крахмала ферментами бактерий заканчивалось к концу первых суток после начала опыта. К концу суток палочки со спорой начинали бледнеть, истончаться и исчезать, но споры оставались и переходили в неактивную стадию хранения. Они вновь становились круглыми, уменьшались в размере, у них исчезал перламутровый зеленый цвет. Другая же часть палочек, которая перешла ранее в состояние нитей, в дальнейшем растворялась без остатка. Гидролизат, полученный методом ферментирования полисахаров зернового сырья с использованием амилолитических микроорганизмов, имел густую консистенцию, коричневый цвет и сладкий вкус.

1 л гидролизата после упаривания (патока) весил 1 кг 250 г. Побочным продуктом биотехнологического процесса были декстрины с оболочками зерна. Вес декстринов в сушеном виде составлял 750 г.

Исследуя биохимический состав патоки из экстрадированной зерновой смеси, установлено, что количество общего сахара в патоке составило 24,22%, а в пересчете на сухое вещество –

68,28%. Помимо сахаров, в продукте содержался белок – 2,28%, а в пересчете на сухое вещество – 6,41%. Препарат обладает большой энергетической ценностью, 1 кг препарата содержит больше одной кормовой единицы. Кроме биохимических веществ патока содержала используемые при её изготовлении амилолитические микроорганизмы.

Испытание патоки на токсичность показало, что она не обладает токсическими свойствами. В отношении перспектив развития метода можно предложить исключить из процесса приготовления патоки процесс фильтрации, тогда в конечном продукте повысится содержание доли растительного белка (максимально до 10%). Резервом для увеличения выхода сахаров из зернового сырья является гидролиз целлюлозы [12]. Из целлюлозы состоят плодовая и семенная оболочки зерновки, а также оболочки клеток алейронового слоя. Целлюлозы содержится в десять раз меньше, чем крахмала, – всего 5-10% от массы зерна. Расщепление целлюлозы до легкоусвояемых сахаров возможно при использовании целлюлозолитических микроорганизмов. Но данная проблема на сегодняшний день ещё не решена нигде в мире даже в условиях лаборатории.

Выводы

Разработанная биотехнология биоконверсии крахмалсодержащего сырья, с использованием штаммов микроорганизмов, позволяет проводить ферментативный гидролиз зерна и получать легкоусвояемые сахара. При этом источником ферментов служат амилолитические штаммы микроорганизма *Bacillus subtilis*, способные продуцировать амилолитический фермент. Установленная нами осахаривающая способность амилолитических штаммов микроорганизма *Bacillus subtilis* может применяться при производстве зерновой патоки из крахмала для применения ее в животноводстве с целью ликвидации дефицита углеводов в организме сельскохозяйственных животных.

Библиографический список

1. Фисинин В.И., Макарецов Н.Г. Технологические основы производства и переработки продукции животноводства. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2003. – С. 175.
2. Мотовилов К.Я., Аксенов В.В., Ермохин В.Г. и др. Технология переработки зернового крахмалсодержащего сырья на кормовые сахара и их использова-

ние в животноводстве: метод. руководство. – Новосибирск, 2012. – 32 с.

3. Коваленко Г.А., Перминова Л.В. Современные технологии переработки растительного сырья в сахаристые крахмалопродукты (патоки, сиропы) // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 1. – С. 80.

4. Верховцева Н.В., Г.А. Осипов Свойства и трофические связи основных групп микроорганизмов отделов кишечника и фекалий по данным измерений микробных маркеров методом ГХ-МС // Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы: сб. матер. Междунар. конф. – М., 2004. – С. 20-64.

5. Саторов Н.Р. Технология производства пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* и их лечебно-профилактическая эффективность при инфекционных энтеритах телят: автореф. дис. ... докт. вет. наук. – Душанбе, 2012. – 36 с.

6. Лукин Н.Д., Ананских В.В., Лapidус Т.В. и др. О развитии технологии сахаристых продуктов из крахмала // Пища, экология, качество: тр. VII Междунар. науч.-практ. конф. – Краснообск, 2010. – С. 147-149.

7. Соловьева С.Ю. Разработка технологии биоконверсии крахмала при производстве патоки различного углеводного состава: дис. ... канд. техн. наук. – М., 2004. – 172 с.

8. Похиленко В.Д., Перелыгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2-3 (32-33). – С. 20-41.

9. Донченко А.С., Мотовилов К.Я., Бугаков Ю.Ф. и др. Использование углеводной кормовой добавки, полученной из зерна пшеницы и ржи в рационах лактирующих коров: метод. рекомендации. – Краснообск: Юпитер, 2006. – 22 с.

10. Тарабукин Д.В. Ферментативный гидролиз как способ повышения питательной ценности трудноусваиваемых компонентов кормов // Актуальные проблемы биологии и экологии: матер докл. I Всерос. Коми респуб. молодежной науч. конф. – Сыктывкар, 2007. – С. 246-249.

11. Фисинин В.И. Технологические основы производства и переработки продуктов животноводства / под ред. Н.Г. Макартцева. – М.: Изд-во МГТУ, 2003. – 94 с.

12. Синицин А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: учеб. пособие. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 222 с.

References

1. Fisinin V.I., Makartsev N.G. Tekhnologicheskie osnovy proizvodstva i pererabotki produktov

zhivotnovodstva. – M.: Izd-vo MGTU im. N.E. Baumana, 2003. – S. 175.

2. Motovilov K.Ya., Aksenov V.V., Ermokhin V.G. i dr. Tekhnologiya pererabotki zernovogo krakhmalso-derzhashchego syrya na kormovye sakhara i ikh ispol-zovanie v zhivotnovodstve: metod. rukovodstvo. – Novosibirsk, 2012. – 32 s.

3. Kovalenko G.A., Perminova L.V. Sovremennye tekhnologii pererabotki rastitelnogo syrya v sakharistye krakhmaloprodukty (patoki, siropy) // Fundamentalnye issledovaniya. – 2008. – № 1. – S. 80.

4. Verkhovtseva N.V., Osipov G.A. Svoystva i troficheskie svyazi osnovnykh grupp mikroorganizmov otdelov kishechnika i fekaliiy po dannym izmereniy mikrobnykh markerov metodom GKh-MS // Probiotiki, prebiotiki, sinbiotiki i funktsionalnye produkty pitaniya. Sovremennoe sostoyanie i perspektivy: sb. mat-lov Mezhdunar. konf. – M., 2004. – S. 20-64.

5. Satorov N.R. Tekhnologiya proizvodstva probiotikov na osnove *Bacillus subtilis* i ikh lechebno-profilakticheskaya effektivnost pri infektsionnykh enteritakh telyat: avtoref. dis. ... d-ra vet. nauk. – Dushanbe, 2012. – 36 s.

6. Lukin N.D., Ananskikh V.V., Lapidus T.V. i dr. O razvitiit tekhnologii sakharistykh produktov iz krakhmala // Pishcha, ekologiya, kachestvo: tr. VII mezhdunar. nauch.-prakt. konf. – Krasnoobsk, 2010. – S. 147-149.

7. Soloveva S.Yu. Razrabotka tekhnologii biokonversii krakhmala pri proizvodstve patoki razlichnogo uglevodnogo sostava: dis. ... kand. tekhn. nauk. – M., 2004. – 172 s.

8. Pokhilenko V.D., Perelygin V.V. Probiotiki na osnove sporoobrazuyushchikh bakteriy i ikh bezopasnost // Khimicheskaya i biologicheskaya bezopasnost. – 2007. – № 2-3 (32-33). – S. 20-41.

9. Donchenko A.S., Motovilov K.Ya., Bugakov Yu.F. i dr. Ispolzovanie uglevodnoy kormovoy dobavki, poluchennoy iz zerna pshenitsy i rzhi v ratsionakh laktiruyushchikh korov: metod. rekomendatsii. – Krasnoobsk: Yupiter, 2006. – 22 s.

10. Tarabukin D.V. Fermentativnyy gidroliz kak sposob povysheniya pitatelnoy tsennosti trudnoosvaivaemykh komponentov kormov // Aktualnye problemy biologii i ekologii: mat-ly dokladov I Vseros. Komi respub. molodezhnoy nauch. konf. – Syktyvkar, 2007. – S. 246-249.

11. Fisinin V.I. Tekhnologicheskie osnovy proizvodstva i pererabotki produktov zhivotnovodstva; pod red. N.G. Makartseva. – M.: Izd-vo MGTU, 2003. – 94 s.

12. Sinitsin A.P., Gusakov A.V., Chernoglazov V.M. Biokonversiya lignotsellyuloznykh materialov: ucheb. posobie. – M.: Izd-vo MGU, 1995. – 222 s.

