

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕГКОУСВОЯЕМЫХ САХАРОВ
ИЗ ЗЕРНА ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА

N.V. Donkova, S.A. Donkov

BIOTECHNOLOGY OF RECEIVING DIGESTIBLE SUGARS
FROM GRAIN FOR ANIMAL HUSBANDRY

Донкова Н.В. – д-р вет. наук, проф., зав. каф. анатомии, патологической анатомии и хирургии Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: dnv-23@mail.ru

Донков С.А. – канд. биол. наук, доц. каф. анатомии, патологической анатомии и хирургии Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: dnv-23@mail.ru

Donkova N.V. – Dr. Vet. Sci., Prof., Head, Chair of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: dnv-23@mail.ru

Donkov S.A. – Cand. Biol. Sci., Assoc. Prof., Chair of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: dnv-23@mail.ru

Разработана биотехнология получения сахаров (патоки) из экструдированной зерновой смеси с использованием амилолитических микроорганизмов. В качестве зернового сырья использовали зерновую смесь (пшеница + овес). 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 часа. Вначале споры созревают, увеличиваются в размерах, приобретают яйцевидную форму, через 12 часов прорастают и разжижают крахмальный клейстер, через 14 часов у палочки формируется гранулеза, через 18 часов спора на конце палочки исчезает, а макронуклеус вместе с гранулезой расходятся к противоположным концам палочки, через 20 часов у дочерних палочек появляется спора, через 24 часа палочка исчезает. Гидролизат, полученный методом ферментирования полисахаров зернового сырья с использованием амилолитических микроорганизмов, имеет густую консистенцию, коричневый цвет и сладкий вкус. Один литр гидролизата после упаривания весил 1 кг 250 г. Количество общего сахара в гидролизате составило 24,22 %, в пересчете на сухое вещество – 68,28 %; бел-

ка – 2,28 %, в пересчете на сухое вещество – 6,41 %. Препарат обладает большой энергетической ценностью, один килограмм 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.

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

The biotechnology of receiving sugars (molasses) from extruded grain mix with the use of amylolytic microorganisms was developed. As grain raw material grain mix (wheat + oats) was used. Enzymatic hydrolysis of starch was carried out by mix of strains of microorganism of *Bacillus subtilis*: № 2 – amylolytic, № 9 – amylolytic and № 12 – amylolytic. It was established that nutrient medium of full cycle of development of the studied microorganisms came to the end in 24 hours. In the beginning spores ripened, increased in sizes, got an

ovoid form, in 12 hours swelled and liquefied starch paste, after 14 hours on the sticks granulose was formed, in 18 hours a spore at the end of the wand disappeared, and macronucleus with granulated divergent to opposite ends of the sticks, after 20 hours, the new sticks received a spore, after 24 hours, the wand disappeared. The hydrolysate obtained by fermentation polysugars grain raw materials with use of amyolytic microorganisms, had a dense consistence, brown color and sweet taste. 1 liter of the hydrolysate after evaporation weighed 1 kg 250 grams. The amount of total sugar in the hydrolysate reached 24.22 %, calculated on dry matter – 68.28 %; protein – 2.28 %, calculated on dry matter – 6.41 %. The drug had high energy content; one kilogram of the drug contained more than one feeding unit. Established ability of amyolytic strains of microorganisms *Bacillus subtilis* to sugar grain mixes can be used in farming with the aim of eliminating the shortage of carbohydrates in the body of farm animals. Experimental samples of molasses are non-toxic and have a high energy value. The technology is recommended for obtaining molasses in industrial scale.

Keywords: animal husbandry, biotechnology, amyolytic microorganisms, sugars, grain.

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 высокоэнергос затратным, 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 микроорганизмов, продуцирующих амилолитический фермент в

гидролизе крахмала, является альтернативной технологией к технологии микробиологической биоконверсии, при этом сырье для производства кормовой добавки проходит обработку в среде, аналогичной микрофлоре рубца и начального участка пищеварительного тракта [4], т. е. первый этап пищеварения – подготовка корма к перевариванию начинается вне организма. Отсутствующие в пищеварительном тракте животного ферменты компенсированы 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 микроорганизмы, 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 микроорганизмов в качестве субстратов для питательных сред могут использоваться разнообразные виды сырья.

Что касается субстратов, то современные технологии идут по двум главным направлениям [6, 7]: переработка низкокачественных бросовых продуктов или же использование легкодоступных углеводов с целью получения за их счет микробной биомассы, содержащей высококачественный белок. 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.

Цель исследования: разработка технологии получения легкоусвояемых сахаров из зерна с использованием культуры микроорганизмов.

В задачи исследования входило изучение влияния цикла развития микроорганизмов, продуцирующих амилолитический фермент на степень осахаривания крахмала в зерне и определение биохимического состава гидролизата из зернового сырья.

Материалы и методы исследования. 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 ГосНИИгенетика (г. Москва). Каждому штамму присвоен номер и дано название: *Bacillus subtilis* № 2 – *amylolytic*, *Bacillus subtilis* № 9 – *amylolytic* и *Bacillus subtilis* № 12 – *amylolytic*. Штаммы приняты на национальное патентное депонирование во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

В качестве зернового сырья использовали зерновую смесь (пшеница+овес). Смесь заливали водой, доводили до кипения, охлаждали до $t = 75\text{ }^{\circ}\text{C}$ и добавляли споры 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 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение одних суток. Степень осахаривания крахмала контролировали по наличию цветной реакции с 0,02 н. водным раствором йода и раствором Люголя. Определение биохимического состава гидролизата проводили в научно-исследовательском испытательном центре по контролю качества сельскохозяйственно-

го 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 проводили 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 проводили при помощи математических функций в электронных таблицах Ms Excel.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате изучения цикла развития микроорганизмов, продуцирующих амилолитические ферменты, 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 происходил 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 темно-синий 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 кле-

ток, 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 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, тело палочки растворялось, и оставались только споры, а палочки, которые образовывали нити, растворялись без остатка. Исчезновение палочек происходило через 24 от начала культивирования. Во время своего роста и деления бактерии выделяли в окружающую среду сначала разжижающий фермент, затем осахаривающий фермент, амилаза и амилопектин крахмала расщеплялись до молекул мальтозы и далее до глюкозы. При изучении динамики изменения окрашивания крахмального клейстера препаратами йода были получены следующие результаты: 0,02 н. водный раствор йода по мере расщепления амилазы 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. 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 ферментиро-

вания полисахаров зернового сырья с использованием амилаолитических микроорганизмов, имел густую консистенцию, коричневый цвет и сладкий вкус.

Один литр гидролизата после упаривания (патока) имел массу 1 кг 250 г. Побочным продуктом биотехнологического процесса были декстрины с оболочками зерна. Масса декстринов в сушеном виде составлял 750 г.

При исследовании биохимического состава патоки из экструдированной 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, один килограмм препарата содержит 1,2 кормовой единицы. Кроме биохимических веществ патока содержала используемые при ее изготовлении микроорганизмы. Испытание патоки на токсичность показало, что патока 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 еще не решена нигде в мире, даже в условиях лаборатории.

Выводы. Разработана технология получения легкоусвояемых сахаров из зерна для животноводства. Источником ферментов служат штаммы микроорганизма *Bacillus subtilis*, способные продуцировать амилаолитический фермент.

Эти штаммы могут применяться при производстве зерновой патоки для применения ее в животноводстве с целью ликвидации дефицита углеводов в организме сельскохозяйственных животных.

Литература

1. Фисинин В.И., Макарецев Н.Г. Технологические основы производства и переработки продукции животноводства. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2003. – С. 175.
2. Технология переработки зернового крахмалсодержащего сырья на кормовые сахара и их использование в животноводстве: метод. руководство / К.Я. Мотовилов, В.В. Аксенов, В.Г. Ермохин [и др.]. – 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., Осипов Г.А. 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. мат-лов междунар. конф. – М., 2004. – С. 20–64.
5. Сатторов Н.Р. Технология производства пробиотиков на основе *Bacillus subtilis* и их лечебно-профилактическая эффективность при инфекционных энтеритах телят: автореф. дис. ... д-ра вет. наук. – Душанбе, 2012. – 36 с.
6. О развитии технологии сахаристых продуктов из крахмала // Пища, экология, качество: тр. VII междунар. науч.-практ. конф. / Н.Д. Лукин, В.В. Ананских, Т.В. Лapidус [и др.]. – 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., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3 (32–33). – С. 20–41.
9. Использование углеводной кормовой добавки, полученной из зерна пшеницы и ржи в рационах лактирующих коров: метод. рекомендации / А.С. Донченко, К.Я. Мотовилов, Ю.Ф. Бугаков [и др.]. – Краснообск: Юпитер, 2006. – 22 с.
10. Тарабукин Д.В. Ферментативный гидролиз как способ повышения питательной ценности трудноусваиваемых компонентов кормов // Актуальные проблемы биологии и экологии: мат-лы докладов 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. Макарецева. – 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.

Literatura

1. Fisinin V.I., Makarcev N.G. Tehnologicheskie osnovy proizvodstva i pererabotki produktsii zhivotnovodstva. – M.: Izd-vo MGTU im. N.E. Bauman, 2003. – S. 175.
2. Tehnologija pererabotki zernovogo krahmalso-dershshhego syr'ja na kormovye sahara i ih ispol'zovanie v zhivotnovodstve: metod. rukovodstvo / K.Ja. Motovilov, V.V. Aksenov, V.G. Ermohin [i dr.]. – Novosibirsk, 2012. – 32 s.
3. Kovalenko G.A., Perminova L.V. Sovremennye tehnologii pererabotki rastitel'nogo syr'ja v saharistye krahmaloprodukty (patoki, siropy) // Fundamental'nye issledovanija. – 2008. – № 1. – S. 80.
4. Verhovceva N.V., Osipov G.A. Svoystva i troficheskie svjazi osnovnyh grupp mikroorganizmov otdelov kishechnika i fekalij po dannym izmerenij mikrobnih markerov metodom GH-MS // Probiotiki, prebiotiki, sinbiotiki i funkcional'nye produkty pitanija. Sovremennoe sostojanie i perspektivy: sb. mat-lov mezhdunar. konf. – M., 2004. – S. 20–64.
5. Sattorov N.R. Tehnologija proizvodstva probiotikov na osnove *Bacillus subtilis* i ih lechebno-profilakticheskaja jeffektivnost' pri infekcionnyh jenteritah teljat: avtoref. dis. ... d-ra vet. nauk. – Dushanbe, 2012. – 36 s.
6. O razvitii tehnologii saharistyh produktov iz krahmala // Pishha, jekologija, kachestvo: tr. VII mezhdunar. nauch.-prakt. konf. / N.D. Lukin, V.V. Ananskih, T.V. Lapidus [i dr.]. – Krasnoobsk, 2010. – S. 147–149.

7. Solov'eva S.Ju. Razrabotka tehnologii biokonversii krahmala pri proizvodstve patoki razlichnogo uglevodnogo sostava: dis. ... kand. tehn. nauk. – M., 2004. – 172 s.
8. Pohilenko V.D., Perelygin V.V. Probiotiki na osnove sporoobrazujushhih bakterij i ih bezopasnost' // Himicheskaja i biologicheskaja bezopasnost'. – 2007. – № 2–3 (32–33). – S. 20–41.
9. Ispol'zovanie uglevodnoj kormovoj dobavki, poluchenoj iz zerna pshenicy i rzhi v racionah laktirujushhih korov: metod. rekomendacii / A.S. Donchenko, K.Ja. Motovilov, Ju.F. Bugakov [i dr.]. – Krasnoobsk: Jupiter, 2006. – 22 s.
10. Tarabukin D.V. Fermentativnyj gidroliz kak sposob povyshenija pitatel'noj cennosti trudnousvaivaemyh komponentov kormov // Aktual'nye problemy biologii i jekologii: mat-ly dokladov I Vseros. Komi respub. molodezhnoj nauch. konf. – Syktyvkar, 2007. – S. 246–249.
11. Fisinin V.I. Tehnologicheskie osnovy proizvodstva i pererabotki produktov zhivotnovodstva / pod red. N.G. Makarceva. – M.: Izd-vo MGTU, 2003. – 94 s.
12. Sinicin A.P., Gusakov A.V., Chernoglazov V.M. Biokonversija lignocelljuloznyh materialov: ucheb. posobie. – M.: Izd-vo MGU, 1995. – 222 s.



УДК 631.16

**А.В. Коломейцев, Н.А. Мистратова,
М.А. Янова**

АНАЛИЗ СОВРЕМЕННОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ОПЫТА ГОСУДАРСТВЕННОЙ ПОДДЕРЖКИ В РАЗЛИЧНЫХ СУБЪЕКТАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ*

**V.A. Kolomeytsev, N.A. Mistratova,
M.A. Yanova**

ANALYSIS OF THE CURRENT STATE OF ORGANIC AGRICULTURE AND EXPERIENCE OF STATE SUPPORT IN VARIOUS SUBJECTS OF THE RUSSIAN FEDERATION

Коломейцев А.В. – канд. биол. наук, начальник управления науки и инноваций Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: avk1978@list.ru

Мистратова Н.А. – канд. с.-х. наук, доц. каф. растениеводства и плодовоовощеводства Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: mistratova@mail.ru

Янова М.А. – канд. с.-х. наук, доц. каф. товаро-ведения и управления качеством продукции АПК Красноярского государственного аграрного университета, г. Красноярск. E-mail: yanova.m@mail.ru

Kolomeytsev A.V. – Cand. Biol. Sci., Head, Department of Science and Innovations, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: avk1978@list.ru

Mistratova N.A. – Cand. Agr. Sci., Chair of Plant Growing and Fruit-and-Vegetable Growing, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: mistratova@mail.ru

Yanova M.A. – Cand. Agr. Sci., Assoc. Prof., Chair of Merchandizing and Product Quality Control of AIC, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk. E-mail: yanova.m@mail.ru

*Исследование выполнено при финансовой поддержке краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности в рамках научного проекта № 09/17 от 22.06.2017 «Разработка нормативно-технической документации и технологических рекомендаций по производству овощей, соответствующих требованиям ГОСТ Р 56508–2015 "Продукция органического производства" и организации органического сельскохозяйственного производства».