DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-5-7
УДК 636.03:663.12

Биологически активные добавки для животных на основе конверсии вторичных биоресурсов микробного происхождения

Серба Е.М.
Serba E.M.

¹Серба Е.М., доктор биологических наук, профессор РАН, зам. директора

¹Оверченко М.Б., кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник отдела биотехнологии ферментов, дрожжей, органических кислот и БАД

¹Римарева Л.В., доктор технических наук, академик РАН, главный научный сотрудник отдела биотехнологии ферментов, дрожжей, органических кислот и БАД

²Фролова М.А., доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела получения биологически активных веществ

²Албулов А.И., доктор биологических наук, профессор, зав.отделом получения биологически активных веществ

²Гринь С.А., доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, директор

³Серба Е.В., студент ekaterina.serba98@mail.ru

¹Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи (ВНИИПБТ – филиал ФГБУН "ФИЦ питания и биотехнологии"), Москва, Самокатная, д. 46, e-mail: serbae@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности (ФГБНУ "ВНИТИБП") Минобрнауки, Московская обл., Щелковский р-н, п.Биокombината, стр.17. e-mail: vnitibp@mail.ru

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина), Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23

Ключевые слова: кормовые добавки, дрожжевой ферментализат, аминокислота, пептиды, биотехнология

Biologically active additives for animals based on the conversion of secondary biological resources of microbial origin

¹Serba E.M., Doctor Of Biological Sciences, Professor Of RAS

¹Overchenko M. B., Phd, Senior Researcher Of The Department Of Biotechnology Of Enzymes, Yeasts, Organic Acids And BAD

¹Rimareva L. V., Doctor Of Technical Sciences, Academician Of RAS, Chief Researcher Of The Department Of Biotechnology Of Enzymes, Yeasts, Organic Acids And BAD

²Frolova M.A., Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher BAV

2FSBEI VNITIBP RAS, M.O., Shchelkovsky district, p. Biokombinata, 17, VNITIBP, e-mail: vnitibp@mail.ru

²Albulov A.I., Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of BAS,

Serba E. V., student of FSBEI MGAVMIB - MVA K. I. Skryabin, Moscow, Akademika Skryabina, 23, e-mail: ekaterina.serba98@mail.ru

²Grin S.A., Doctor of Biological Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, Director

¹Deputy Director VNIIPBT - Branch "Of The Federal Its Power And Biotechnology", Moscow, Samokatnaya, 4B, e-mail: serbae@mail.ru

²FSBEI VNITIBP RAS, M.O., Shchelkovsky district, p. Biokombinata, 17, VNITIBP, e-mail: vnitibp@mail.ru

Key words: feed additives, yeast fermentolizate, amino acid, peptides, biotechnology.

Abstract. New approaches, methods and processes have been developed to create biotechnology of deep processing of secondary bioresources of microbial origin into biologically active peptide-amino acid additives for animals. The tests confirmed the forage effectiveness of PROTAMIN biologics and showed that they have a positive effect on the organisms of animals, fish, birds and bees, increasing their viability and productivity.

Резюме. Разработаны новые подходы, методы и процессы для создания биотехнологии глубокой переработки вторичных биоресурсов микробного происхождения в биологически активные пептидно-аминокислотные добавки для животных. Проведенные испытания подтвердили кормовую эффективность применения биопрепаратов ПРОТАМИН и показали, что они оказывают положительное влияние на организмы животных, рыбы, птиц и пчел, повышая их жизнеспособность и продуктивность.

Создание инновационных биотехнологий глубокой переработки сельскохозяйственного сырья и вторичных биоресурсов АПК базируется на биосинтетических и биокаталитических процессах, а также на использовании физиологически активных штаммов микроорганизмов [1, 2].

Микроорганизмы как продуценты белка имеют ряд преимуществ по сравнению с высокоурожайными растениями и высокопродуктивными сельскохозяйственными животными. Главное преимущество – высокая скорость роста и биосинтеза, основанная на возможности использования

Для цитирования / For citation

Биологически активные добавки для животных на основе конверсии вторичных биоресурсов микробного происхождения / Е.М. Серба [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2019. - №.5 - С. 22-24

Dietary supplements for animals based on the conversion of secondary biological resources of microbial origin / E.M. Serba [et al.] // Veterinaria I kormlenie. - M., 2019. - No. 5 - P.22-24

микроорганизмами самой разнообразной органики в качестве питательного субстрата. Микробиологический синтез – регулируемый промышленный процесс, обеспечиваемый представителями различных таксономических групп микроорганизмов. [2, 3].

В бродильных производствах ключевыми объектами микробного происхождения являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, сбраживающие углеводы зернового сырья на спирт, и мицелиальные грибы рода *Aspergillus*, обладающие способностью синтезировать комплекс ферментов широкого спектра действия для эффективного гидролиза полимеров сельхозсырья. На спиртовых заводах образуется существенное количество вторичных биоресурсов микробного происхождения – остаточная биомасса дрожжей и мицелиальных грибов. Микробная биомасса не подлежит длительному хранению и является источником загрязнения окружающей среды канцерогенами, иммунносупрессорами и особенно аллергенами. В то же время данные о том, что в биомассе грибов и дрожжей содержатся значительное количество белковых веществ, нуклеиновых кислот, хитина, ценных полисахаридов, делают отходы производства привлекательным сырьем для получения биологически ценных препаратов [4-7].

Цель исследований – получение и характеристика биологически активных добавок для животных на основе ферментативной деструкции полисахаридов клеточных стенок и белковых веществ биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Материалы и методика исследований

Объектом исследований служила биомасса дрожжей *S. cerevisiae*.

Для биокаталитической деструкции клеточных стенок и внутриклеточных полимеров дрожжей использовали ферментные препараты (ФП): протеолитического действия (КФП), полученный на основе селекционированного штамма *Aspergillus oryzae*, содержащий наряду с пептидазами и протеиназами нуклеазу, β -глюканазу, и хитиназу, а также ФП Глюконофетидин – источник протеиназы, экзо- и эндо- β -глюканазы, хитиназы и маннаназы, синтезированный грибом *Aspergillus foetidus*.

Процесс гидролиза белковых веществ и полисахаридов тестировали по степени накопления аминного азота и редуцирующих веществ в ферментолизатах дрожжей. Спектральный анализ состава низкомолекулярных пептидов определяли методом ВЭЖХ на квадрупольной масс-спектрометрической системе Agilent 6120. Содержание аминокислот в микробной биомассе и ферментолизатах определяли на хроматографе KNAUER EUROCHROM 2000 с последующим детектированием компонентов спектрофотометрическим детектором Smartline UV Detector 2500 (Германия) при $\lambda=570$ нм.

Результаты исследований

Технология производства ПРОТАМИНА апробирована на ООО "Биопрогресс" ВНИТИБП. Направленную биокаталитическую деструкцию полимеров микробной биомассы проводили в реакторе, снабженном мешалкой. Дрожжевую суспензию с содержанием растворимых сухих веществ 20% подвергали термолизу при температуре 80–90°C в течение 15–20 минут для инактивации эндогенных ферментов. Термостатированные дрожжи использовали в качестве субстрата для получения кормовых добавок. После проведения процесса ферментативного гидролиза биопрепараты концентрировали на распылительной сушилке. В результате испытаний осуществлена наработка 3-х биопрепаратов ПРОТАМИН – ферментолизатов

дрожжевой биомассы с заданной степенью деструкции субклеточных полимеров.

Для получения кормовой добавки ПРОТАМИН К1 (с низкой степенью деструкции) суспензию дрожжей после термостатирования и пастеризации охлаждали до 50°C и подвергали биокаталитическому воздействию. На первом этапе был задан Глюконофетидин – источник ферментов, катализирующих гидролиз полимеров клеточных стенок дрожжей. Инкубационную смесь выдерживали при этой температуре в течение 4-х часов. По окончании гидролиза 1/2 массы отбирали и подвергали сушке на распылительной сушилке. На первом этапе получен биопрепарат ПРОТАМИН К1 (табл.1).

Для получения кормовой добавки ПРОТАМИН К2 с более глубокой степенью деструкции в частично гидролизованную оставшуюся дрожжевую массу при температуре 40–50 °C вносили дополнительно КФП – источник пептидаз и протеиназ, и подвергали дальнейшему ферментализу в течение еще 2-х часов; общая продолжительность ферментализа составила 6 ч. По окончании процесса прогидролизованную массу пастеризовали и сушили, получая препарат с более высоким содержанием свободных аминокислот и коротких пептидов (табл. 1). На третьем этапе, для получения биопрепарата ПРОТАМИН К3 с высокой степенью деструкции субклеточных структур температуру инкубационной массы снизили до 30–35°C и продолжили ферментализ в течение еще 12-ти часов. Общая продолжительность процесса составила 18 ч.

Препараты, полученные на основе ферментолизатов дрожжевой биомассы (ПРОТАМИН), могут быть предложены в качестве биологически активных добавок, так как известно, что свободные аминокислоты (АК) и короткие пептиды легко ассимилируются, всасываются в кровь и активизируют обменные процессы в организме животных. В биопрепарате ПРОТАМИН К3 отмечено наиболее высокое содержание аминокислот в свободной форме – более 50% от общего количества АК (табл.1).

Результаты исследований молекулярно-массового распределения пептидных фракций в процессе гидролиза дрожжевой биомассы подтвердили эффективность деструктивных процессов, приводящих к образованию пептидов с более низкой молекулярной массой (ММ). С увеличением длительности ферментализа отмечено существенное увеличение количества низкомолекулярных пептидов с ММ менее 300 Да (табл. 2).

Наличие низкомолекулярных пептидов, а также свободных аминокислот, в том числе незаменимых, участвующих в регуляции различных биологических процессов, способствует улучшению усвояемости ферментолизатов дрожжей, и позволяет рассматривать их как биологически активные пептидно-аминокислотные ингредиенты кормов с функциональными свойствами [8-11].

Показана перспективность использования продуктов биоконверсии дрожжевой биомассы в качестве эффективных добавок, повышающих биологическую ценность кормов. По данным проведенных комплексных испытаний установлено, что применение дрожжевого ферментолизата

ПРОТАМИН, выработанного на ООО "Биопрогресс", оказывает положительное влияние на организмы крупного рогатого скота (КРС), рыбы, птиц и пчел, повышает их жизнеспособность и продуктивность.

Во ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства проведены испытания ферментолизатов дрожжевой биомассы ПРОТАМИН К1 и К2 в составе стартового комбикорма

Таблица 1. Характеристика ферментоллизатов дрожжевой биомассы
Tabl. 1. Characterization of yeast biomass fermentolysates

Препарат	Характеристика биопрепаратов ПРОТАМИН				
	Аминный азот, %	PВ, %	ОРВ, %	Сырой протеин, %	Свободные АК, % от общих
ПРОТАМИН К1	1,5	13,7	26,5	51,2	7,3
ПРОТАМИН К2	2,5	14,0	25,6	49,9	17,5
ПРОТАМИН К3	4,0	22,0	25,9	50,1	54,1

Таблица 2. Молекулярно-массовое распределение пептидов в ПРОТАМИНЕ
Tabl. 2 Molecular Mass Distribution of Peptides in PROTAMINE

Молекулярная масса пептидов (ММ), Да	Содержание, %		
	ПРОТАМИН К1	ПРОТАМИН К2	ПРОТАМИН К3
более 1000	33,0	3,2	-
от 500 до 1000	31,6	31,8	7,5
от 300 до 500	25,6	39,3	16,8
менее 300	9,8	25,7	75,7

для личинок осетровых рыб, подтвердившие биологическую эффективность биопрепаратов (повышение интенсивности роста личинок на 18–48%, увеличение массы выращенных мальков на 20–55%).

Результаты испытаний в животноводстве показали, что при выращивании молодняка КРС абсолютный прирост их живой массы увеличивался на 11%, при этом снижались затраты кормов на 8%, что позволяет повысить уровень рентабельности производства говядины – на 6,1 %. Применение препарата ПРОТАМИН К2 при кормлении кур яичных кроссов при добавлении в комбикорма в количестве 5% позволило повысить сохранность поголовья кур, яйценоскость и выводимость суточных цыплят, а также качество яиц. Отмечена тенденция повышения в яйце содержания каротиноидов и селена в 2 раза, витаминов А на 10%, Е на 60%, В1 на 55% и В2 на 5 %.

Разработан и апробирован в производстве регулируемый процесс ферментативного гидролиза дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с получением ферментализованного состава. Установлено, что для обеспечения необходимой степени и глубины гидролиза биополимеров дрожжевых клеток достаточно варьировать длительностью процесса, дозировкой и составом ферментов.

Наработаны опытные партии пептидно-аминокислотных добавок с различным содержанием низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот. Сравнительный анализ спектров пептидов с ММ менее 1000 Да после 6 ч и 18 ч гидролиза показал существенные различия в их составе. Отмечено, что в составе пептидных фракций ферментализата дрожжей (ПРОТАМИН К2) 71,2 % приходилось на долю пептидов с ММ от 1000 до 300 Да, а в ПРОТАМИНе К3 – их количество снизилось до 24,3 %. При этом с увеличением длительности гидролиза содержание пептидов с ММ менее 300 Да и аминокислот в свободной форме повысилось практически в 3 раза.

Откормочные испытания подтвердили биологическую эффективность пептидно-аминокислотных добавок ПРОТАМИН в животноводстве, птицеводстве и рыбном хозяйстве.

Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг. (тема № 0529-2019-0066).

Литература

1. Серба Е.М., Поляков В.А. Биотехнологические основы комплексной переработки зернового сырья и вторичных биоресурсов в этанол и белково-аминокислотные добавки // Монография. - М.: ВНИИПБТ, 2015. - 133.
2. Серба Е.М., Римарева Л.В., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Курбатова Е.И., Волкова Г.С. Погоржельская Н.С. Мартыненко Н.Н. Биотехнологические основы направленной конверсии сельскохозяйственного сырья и вторичных биоресурсов для получения пищевых ингредиентов, функциональных продуктов питания и кормов // Монография. - М.: Изд. БИБЛИО-ГЛОБУС - 2017. - С. 180.

3. Волкова Г.С. Защитно-профилактические добавки с L-формами кислот на основе растительного сырья / Г.С. Волкова, Е.В. Куксова // Пищевая промышленность. 2014. № 3. С. 26-28.
4. Серба Е.М. Мицелиальные грибы - перспективный источник гидролаз и ценных биополимеров / Е.М. Серба [и др.] // Вестник российской сельскохозяйственной науки. - 2016. - № 4, С. 41-43.
5. Sharova N.Y. Beta- glucans from biomass of plant and microbial origin / N.Y. Sharova [et al.] // Food systems, 2019, 2(1), c.23-26.
6. Курбатова Е.И. Микромицет *Aspergillus foetidus*-производитель комплекса гидролитических ферментов / Е.И. Курбатова [и др.] // Микология и фитопатология. 2017. № 1. Т.51. С. 34-40.
7. Серба Е.М. Исследование процесса ферментативного гидролиза биомассы дрожжей для создания пищевых ингредиентов с заданным фракционным составом белковых веществ / Е.М. Серба [и др.] // Вопросы питания, 2017, Т. 86, № 2, С. 76-83.
8. Kulikova O.G. Biologically active peptides isolated from dill *Anethum graveolens* L / O.G. Kulikova [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. - 2015. - V. 51, № 3. - P. 348-366.
9. Бобиев, Г.М. Иммуноактивные пептиды и их координационные соединения в медицине / Г.М. Бобиев, Н.Д. Бунятян, Х.С. Саядян // М.: Издательский дом "Русский врач" - 2009. - 228 с.
10. Серба Е.М. Исследование процесса ферментативного гидролиза биомассы дрожжей для создания пищевых ингредиентов с заданным фракционным составом белковых веществ / Е.М. Серба [и др.] // Вопросы питания. - 2017. - Т. 86, № 2. - С. 76-83.
11. Brar S.K., Dhillon G.S., Sjccl C.R. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals / S.K. Brar, G.S. Dhillon, C.R. Sjccl // Springer. - 2014. - P. 504.
References
1. Serba E.M., Polyakov V.A. Biotechnological fundamentals of the integrated processing of grain raw materials and secondary bioresources into ethanol and protein-amino acid additives // Monograph. - M.: VNIIPBT, 2015. -- 133.
2. Serba E.M., Rimareva L.V., Sokolova E.N., Borscheva Yu.A., Kurbatova E.I., Volkova G.S. Pogorzhezhskaya N.S. Martynenko N.N. Biotechnological principles of the directed conversion of agricultural raw materials and secondary bioresources for obtaining food ingredients, functional food and feed // Monograph. - M.: Publishing. BIBLIO-GLOBUS - 2017. -- S. 180.
3. Volkova G.S. Protective and preventive additives with L-forms of acids based on plant materials / G.S. Volkova, E.V. Kuskova // Food industry. 2014. No. 3. S. 26-28.
4. Serba E.M. Mycelial fungi - a promising source of hydrolases and valuable biopolymers / E.M. Serba [et al.] // Bulletin of the Russian agricultural science. - 2016. - No. 4, S. 41-43.
5. Sharova N.Y. Beta-glucans from biomass of plant and microbial origin / N.Y. Sharova [et al.] // Food systems, 2019, 2 (1), pp. 23-26.
6. Kurbatova E.I. Micromycete *Aspergillus foetidus*-producer of a complex of hydrolytic enzymes / E.I. Kurbatova [et al.] // Mycology and phytopathology. 2017. No 1. T. 51. S. 34-40.
7. Serba E.M. Investigation of the process of enzymatic hydrolysis of yeast biomass to create food ingredients with a given fractional composition of protein substances / E.M. Serba [et al.] // Food Issues, 2017, T. 86, No. 2, P. 76-83.
8. Kulikova O.G. Biologically active peptides isolated from dill *Anethum graveolens* L / O.G. Kulikova [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. - 2015. - V. 51, No. 3. - P. 348-366.
9. Bobiev, G.M. Immunoactive peptides and their coordination compounds in medicine / G.M. Bobiev, N.D. Bunyatyan, H.S. Sayadyan // M.: Russian Doctor Publishing House - 2009. - 228 p.
10. Serba E.M. Investigation of the process of enzymatic hydrolysis of yeast biomass to create food ingredients with a given fractional composition of protein substances / E.M. Serba [et al.] // Food Issues. - 2017. - T. 86, No. 2. - S. 76-83.
11. Brar S.K., Dhillon G.S., Sjccl C.R. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals / S.K. Brar, G.S. Dhillon, C.R. Sjccl // Springer. - 2014. -- P. 504.