

DOI: 10.24411/2074-5036-2020-10009

УДК 579.62+543.544

Ключевые слова: *Candida maltosa*, кормовая добавка, бройлеры, аминокислоты.

Key words: *Candida maltosa*, feed additive, broiler chickens, amino acids.

Рустамов Р. Д., Трофимов О. В., Шапенова Д. С., Третьяков Н. Ю., Пак И. В.

ВЛИЯНИЕ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ *CANDIDA MALTOSA* НА СКОРОСТЬ РОСТА И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ *THE EFFECTS OF A CANDIDA MALTOSA FEED ADDITIVE ON THE GROWTH RATE AND THE AMINO ACID CONTENT OF BROILER CHICKENS MUSCULAR TISSUE*

ФГАОУ Тюменский государственный университет

Адрес: 625003, г. Тюмень, ул. Володарского, 6

Tyumen State University

Address: 625003, Tyumen, Volodarsky street, 6

Рустамов Ризван Дилман оглы, аспирант.

E-mail: rizvanich@mail.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (доб. 16622)

Rustamov Rizvan Dilman oglu, Post-graduate student.

E-mail: rizvanich@mail.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (ext. 16622)

Трофимов Олег Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры экологии и генетики.

E-mail: oleg_v_trofimov@mail.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (доб. 16612)

Trofimov Oleg Vladimirovich, PhD in Biology, Associate professor of the Department of Ecology and Genetics.

E-mail: oleg_v_trofimov@mail.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (ext. 16612)

Шапенова Динара Сериковна, кандидат химических наук.

E-mail: d.shapenova@gmail.com. Тел.: 8 (3452) 597400 (доб. 15208)

Shapenova Dinara Serikovna, PhD in Chemistry.

E-mail: d.shapenova@gmail.com. Тел.: 8 (3452) 597400 (ext. 15208)

Третьяков Николай Юрьевич, кандидат химических наук, директор центра коллективного пользования

«Рациональное природопользование и физико-химические исследования».

E-mail: n.y.tretyakov@utmn.ru. Тел.: 8 (3452) 597590 (доб. 15208)

Tretyakov Nikolay Yuryevich, PhD in Chemistry, Director of the Center for Collective Use

«Rational Nature Management and Physico-Chemical Research».

E-mail: n.y.tretyakov@utmn.ru. Тел.: 8 (3452) 597590 (ext. 15208)

Пак Ирина Владимировна, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой экологии и генетики.

E-mail: pakiv57@mail.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (доб. 16604)

Pak Irina Vladimirovna, Doctor of Biology, Professor, Head Department of Ecology and Genetics.

E-mail: pakiv57@mail.ru. Тел.: 8 (3452) 597400 (ext. 16604)

Аннотация. Для быстрого роста и развития птицы, повышения ее устойчивости к инфекционным заболеваниям и стрессу необходимы корма, полноценные по своему белковому составу. В связи с этим актуальными являются работы, связанные с поиском дешевых биотехнологических добавок, способных заменить в кормах животный и соевый белок. В данной работе исследовано влияние кормовой добавки на основе двух штаммов *Candida maltosa* ВСБ-829 и Тм-12 на скорость роста и аминокислотный состав мышечной ткани у цыплят-бройлеров. Биомассу *Candida maltosa* получали путем культивирования в ферментере с последующим осаждением клеток центрифугированием. Кормление цыплят-бройлеров полученной добавкой начинали с возраста 14 суток и продолжали в течение 40 суток. Контрольные взвешивания проводили через 10 суток. Содержание заменимых и незаменимых аминокислот в мышечной ткани определяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Показано, что микробная добавка в количестве 2% от объема ежесуточного рациона в течение 40 дней улучшает прирост цыплят и увеличивает общее содержание аминокислот в мышечной ткани. Наибольший стимулирующий эффект наблюдали при использовании кормовой добавки на основе штамма *Candida maltosa* Тм-12.

Summary. Animal feeds with the full-scale protein composition are necessary for the rapid growth of poultry and the increase in their resistance to infectious diseases and stress. Therefore, studies associated with the research of cheap biotechnological additives, capable of replacing animal and soybean protein in feeds, are considered to be topical. The

current research is devoted to the effects of a new protein feed additive, created on the basis of two strains: *Candida maltosa* VSB-829 and Tm-12, on the growth rate and the amino acid content of muscular tissue in broiler chickens. The *Candida maltosa* biomass was obtained by cultivation in a fermentor and further precipitation of cells by centrifugation. The feeding of the broiler chickens with the produced additive started in the age of 14 days and lasted for 40 days. The control weightings were being carried out every 10 days. The quantity of both essential and nonessential amino acids in muscular tissue was measured by reversed phase HPLC. The study has shown that the microbial additive in the amount of 2% of the daily ration stimulates the growth of chickens and the increased quantity of the total amino acids in muscular tissue within 40 days. The highest stimulating effect has been observed while using the feed additive on the basis of the *Candida maltosa* Tm-12 strain.

Введение

Решение проблемы продовольственной безопасности связано, прежде всего, с быстрым получением полноценных продуктов питания. Это влечет за собой интенсификацию различных сельскохозяйственных производств. В нашей стране одним из основных источников белковой пищи является мясо цыплят-бройлеров. Для быстрого роста и развития птицы, повышения ее устойчивости к инфекционным заболеваниям и стрессу необходима полноценная кормовая база. Такие требования могут обеспечить комбикорма с растительными и животными добавками, которые значительно увеличивают себестоимость продукта. В связи с этим актуальными являются работы, связанные с удешевлением стоимости комбикормов путем использования дешевых биотехнологических добавок, способных заменить растительный и животный белок. Одним из наиболее перспективных продуктов является микробная добавка [1, 8]. Существуют примеры эффективного использования микробных добавок в животноводстве [5]. По данным ряда авторов, введение в рацион питания птиц микробной биомассы в количестве от 2 до 20% способствовало увеличению прироста цыплят-бройлеров и значительно удешевляло производство [6, 3, 9]. В настоящее время расширяется число видов микроорганизмов, биомасса которых используется в кормах сельскохозяйственных животных и птицы в качестве более дешевого заменителя соевого белка, дорогостоящих животных добавок. Однако, в связи с использованием микробного белка возникает вопрос о полноценности такой замены и качестве получаемых продуктов.

Целью исследования является оценка влияния кормовой добавки на основе *Candida*

maltosa на скорость роста цыплят-бройлеров и качество (по аминокислотному составу) получаемого продукта.

Материал и методы исследования

Исследования были проведены в Тюменском государственном университете в 2014–2015 гг. в Центре биотехнологии и генодиагностики и ЦКП «Химический анализ и идентификация веществ». Для получения кормовой добавки использовали два высокопродуктивных штамма *Candida maltosa*: VCB-829 (по ВКПМ Y-2043) и Tm-12 (по ВКПМ Y-612), приобретенных в ВКПМ ФГУП «ГосНИИгенетика».

Штаммы дрожжей культивировали на питательной среде, состоящей из 2% глюкозы, 1% пептона, 0,5% дрожжевого экстракта. Среды стерилизовали автоклавированием при 121°C и 2 атмосферах в течение 30 минут в горизонтальном автоклаве 3870E («Tuttnauer»). После автоклавирования добавляли антибиотик хлорамфеникол (левомицетин) (500 мкг/мл).

Для получения инокулята производили посев дрожжей в колбу с 500 мл жидкой питательной среды и инкубировали в термостате-качалке «Innova43R» («New Brunswick Scientific») при 28°C и 130 об./мин. в течение суток. Данную культуру использовали как посевной материал (инокулят) для дальнейшего культивирования микроорганизмов в ферментере «BioFlo 115» («New Brunswick Scientific») Суточный инокулят добавляли к предварительно стерилизованной питательной среде объемом 9,5 л, находящейся в ферментере, таким образом, содержание инокулята составляло 5 % от общего рабочего объема. Культивирование дрожжей в ферментере осуществляли при температуре

28°C, pH=7,0 и 60%-ном насыщении кислородом в течение суток. Биомассу из полученной культуры выделяли посредством последовательного осаждения в центрифуге «5804R» («Eppendorf»). Определение содержания белка в сырой биомассе проводили по методу Кьельдаля в соответствии с ГОСТ Р 51417-99 [2].

Полученная клеточная масса использовалась для обогащения добавкой корма цыплят-бройлеров (кросс Арбор Айкерс). Для испытания кормовой добавки были сформированы: три группы опытных цыплят-бройлеров и контрольная группа в возрасте 14 суток. Численность каждой группы по 20 особей. Микробная добавка ежедневно составляла 2% рациона. Кормление стандартной кормосмесью с добавлением микробной добавки продолжали в течение всего опыта. Контрольные взвешивания проводили на 10, 20, 30 и 40-ые сутки. Оценивали относительный среднесуточный прирост массы тела по формуле С. Броди [4].

Определение аминокислотного состава мышц проводили в несколько этапов. Для подготовки образцов около 100 мг куриного мяса помещали в вials объемом 12 мл и добавляли 10 мл 6М раствора HCl, после чего тщательно перемешивали. Вials с завинченными крышками выдерживали в сухо-воздушном термостате при 110°C в течение суток для гидролиза белков. Охлажденный гидролизат фильтровали через мембранный фильтр «Millipore» с диаметром пор 0,45 мкм. Из полученной суспензии отбирали аликвоты объемом 1 мл и упаривали на роторном испарителе при 65°C под вакуумом водоструйного насоса. Конечный сухой остаток растворяли в 1 мл 0,1М HCl, полученные растворы использовали для хроматографического анализа.

Аминокислотный состав определяли методом абсолютной калибровки на хроматографе «Agilent 1100 Series» («Agilent Technologies») на колонке «ZORBAX Eclipse XDB-C18», 4,6×250 мм с диодно-матричным детектором (длина волны детектирования 254 нм) с использованием предколоночной дериватизации. В качестве стандартных были взяты три раствора 15 аминокислот

(Ala, Arg, His, Gly, Gln, Ser, Tyr, Cys, Val, Ile, Leu, Lys, Met, Thr, Phe) с концентрациями 0,10, 0,25 и 1,00 нмоль/мкл в 0,1М соляной кислоте фирмы «Agilent Technologies». Процесс дериватизации включал следующую последовательность стадий: смешение 0,5 мкл раствора аминокислот и 2,5 мкл боратного буфера (0,4Н, pH=10,2), дериватизация 0,5 мкл раствора ОФА/3-МПК (орто-фталевый альдегид и 3-меркаптопропионовая кислота с концентрацией 10 мг/мл в боратном буфере, Agilent Technologies), разбавление 28 мкл деионизованной воды.

Разделение осуществляли при постоянной температуре колонки 40°C. Использовали градиентный режим элюирования 6 мМ раствором ацетата натрия с pH=5,5 (компонент А) и 1%-ным раствором изопропилового спирта в ацетонитриле (компонент В) (с повышением объемной доли компонента В с 4% до 40% в течение 41 минуты). Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам и с использованием прикладных программ *MS Excel* и *Statistica*.

Обсуждение результатов

При испытании кормовых добавок использовали следующие варианты: биомасса *Candida maltosa* ВСБ-829, биомасса *Candida maltosa* ТМ-12 и их смесь (ВСБ-829+ТМ-12) в соотношении 1:1. Содержание белка (по Кьельдалю) в клеточной массе дрожжей составляло 75,11%. Динамика изменения массы тела цыплят представлена в таблице 1. На начальном этапе (возраст 14 сут.) цыплята в контрольной группе были в среднем на 50,4 г, 28,9 г и 14,7 г крупнее цыплят из опытных групп ВСБ-829+ТМ-12; ТМ-12 и ВСБ-829 соответственно. К 20-м суткам цыплята, получавшие с кормом микробный белок *Candida maltosa* ВСБ-829 и ТМ-12, достигли показателей контрольных птиц. Исключение составила группа, получавшая комбинированную добавку ВСБ-829+ТМ-12. Небольшое преимущество у цыплят из опытной группы ВСБ-829 начинает наблюдаться к 40 суткам.

Оценка скорости роста цыплят по показателям относительного среднесуточного (за 10 сут.) прироста показала, что, несмотря

на замещение двух процентов стандартной кормовой смеси на микробную добавку, цыплята, получавшие *Candida maltosa* ВСБ-829 и Тм-12, продемонстрировали лучшие показатели прироста в сравнении с контролем (рис. 1). Комбинация двух микробных продуктов штаммов *Candida maltosa* ВСБ-829+Тм-12 не оказывает подобного действия. Относительный прирост у цыплят в этой группе на заключительной стадии опыта (после 3 контрольного взвешивания) оказался в среднем на 1,94% ниже, чем в контрольной группе.

Очевидно, на первых этапах кормления идет адаптация к новой добавке, а реализация ее преимуществ начинает проявляться позже.

Определение аминокислотного состава проб мышц (табл. 2) после кислотного гидролиза белков проводили методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией о-фталевым альдегидом в присутствии 3-меркаптопропионовой (3-МПК) кислоты со спектрофотометрическим детектированием образующихся дериватов [10, 11].

Дериватизация о-фталевым альдегидом совместно с нуклеофильным серосодержащим агентом выбрана как наиболее простой, поддающийся автоматизации способ, не требующий дополнительного удаления реагентов или экстракции дериватов. Был использован метод абсолютной калибровки, коэффициенты корреляции градуировочных прямых имеют значения более 0,99,

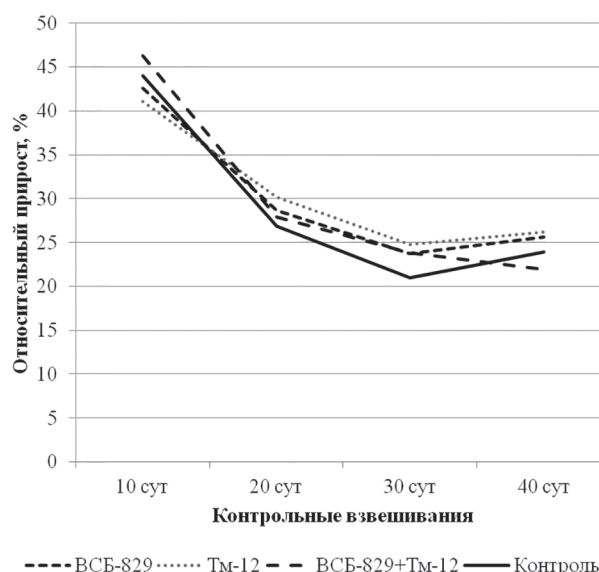


Рис. 1. Относительный прирост цыплят.

исключение составляет аргинин, для которого $R_2 = 0,981$. Качество хроматографического разделения при выбранном режиме хроматографирования подтверждается величиной коэффициента разрешения наиболее трудно-разделимой пары [7] аминокислот лейцин/изолейцин $R_s = 1,9$.

Полученные значения аминокислотного состава мяса согласуются с литературными данными [11], общее содержание первичных аминокислот колеблется между 80 и 250 г/кг (табл.3). Выявлены достоверные различия по содержанию отдельных аминокислот между контрольным и опытными вариантами. Введение в рацион питания цыплят-бройлеров кормовых добавок ВСБ-829 и Тм-12 увеличивает содержание аминокислот: Gln, Arg, Val, Ile, Leu, Phe. Использование двух

Таблица 1

Влияние микробной кормовой добавки на результаты контрольных взвешиваний цыплят-бройлеров

Контрольные взвешивания	Средняя масса одного цыпленка, г			
	ВСБ-829	Тм-12	ВСБ+Тм-12	Контроль
Начало опыта (возраст — 14 суток)	447,0±3,89	432,8±4,17*	411,3±3,39*	461,7±3,81
1 (через 10 суток)	689,2±8,70**	657,0±12,05*	659,2±12,08*	722,2±10,37
2 (через 20 суток)	920,2±15,08	890,8±20,79**	873,2±19,14**	946,9±19,18
3 (через 30 суток)	1167,3±15,34	1143,1±17,51	1109,2±17,84**	1169,4±23,18
4 (через 40 суток)	1510,0±19,76	1487,5±22,54	1382,6±18,10	1486,6±20,18

Примечание: * – различия между контрольным и опытными вариантами достоверны при $P < 0,01$;

** – при $P < 0,05$

Результаты анализа аминокислотного состава мышечной ткани цыплят-бройлеров

№	Наименование аминокислоты	Группа цыплят (N = 5, P = 0,95)				
		Контрольная	ВСБ-829	Тм-12	Тм-12+ВСБ-829	По данным Руденко [11]
		Содержание аминокислот, г/кг				
Заменимые						
1	Ala (Ала)	2,52±0,68	1,89±0,78	7,48±0,80* ^о	1,72±0,81 [^]	6,21±0,69
2	Arg (Арг)	15,53±0,40	16,36±0,30	41,30±0,41* ^о	6,37±0,50* ^{о^}	10,06±0,45
3	His (Гис)	17,63±0,18	24,05±0,15*	31,62±0,12* ^о	21,61±0,23* ^{о^}	3,41±0,16
4	Gly (Гли)	1,49±0,89	1,51±0,88	7,42±0,20* ^о	4,61±0,11 [^]	13,78±0,14
5	Gln (Глн)	9,26±0,11	10,25±0,13*	56,54±0,20* ^о	9,11±0,21 ^{о^}	7,53±0,24
6	Ser (Сер)	2,42±0,19	1,10±0,50	15,88±0,48* ^о	3,10±0,36 [^]	3,06±0,31
7	Tyr (Тир)	3,88±0,20	4,17±0,33	10,73±0,36* ^о	4,53±0,40 [^]	6,25±0,61
8	Cys (Цис)	0,98±0,30	1,28±0,17	1,40±0,28	2,17±0,19	4,04±0,24
Сумма		53,71	61,51	172,5	53,24	54,34
Незаменимые						
9	Val (Вал)	5,40±0,52	5,02±0,41	10,74±0,44* ^о	7,43±0,43 ^{о^}	13,35±0,48
10	Ile (Иле)	2,80±0,66	4,94±0,54	11,92±0,40* ^о	7,80±0,55* ^{о^}	9,37±0,56
11	Leu (Лей)	8,11±0,77	10,20±0,68	26,51±0,54* ^о	12,92±0,71* ^{о^}	9,21±0,40
12	Lys (Лиз)	5,50±0,12	5,23±0,22	2,78±0,33 ^о	9,66±0,30* ^{о^}	19,53±0,15
13	Met (Мет)	1,98±0,10	1,71±0,11	5,61±0,21* ^о	3,02±0,05 ^{о^}	7,57±0,09
14	Thr (Тре)	5,17±0,39	6,50±0,33	5,53±0,42	8,81±0,12* ^о	6,36±0,41
15	Phe (Фен)	4,04±0,18	4,95±0,16*	12,29±0,15* ^о	6,17±0,22* ^о	8,5±0,21
Сумма		33,00	38,55	75,38	55,82	73,89
Общая сумма		86,71	100,60	247,70	109,20	128,40

Примечание: * – различия между контролем и опытными группами статистически достоверны (P<0,01);
^о – различия между ВСБ-829 и Тм-12, между ВСБ-829 и Тм-12+ВСБ-829 статистически достоверны (P<0,01);
[^] – различия между Тм-12 и Тм-12+ВСБ-829 статистически достоверны (P<0,01).

отдельных штаммов *Candida maltosa* оказывает большее влияние на изменение содержания аминокислот, чем их комбинированное применение. Из трех вариантов опробованных добавок наибольшее увеличение содержания заменимых и незаменимых аминокислот в мышечной ткани стимулирует *Candida maltosa* Тм-12.

Заключение

На основании полученных данных можно заключить, что введение кормовых добавок в пищу птиц может приводить к существенному увеличению суммарного содержания аминокислот в мышечной ткани. Эффективность кормления также зависит от разновидности микробных штаммов. В наших исследованиях использование микробных добавок на основе штаммов *Candida maltosa* ВСБ-829

и *Candida maltosa* Тм-12 способствует сохранению прироста массы тела цыплят на уровне контроля и увеличивает суммарное содержание заменимых и незаменимых аминокислот.

Список литературы

1. Банницына Т. Е. Дрожжи в современной биотехнологии / Т. Е. Банницына, А. В. Канарский, А. В. Щербаков, В. К. Чеботарь, Е. И. Кипрушкина // Вестник Международной академии холода. 2016. № 1. С. 24–29.
2. ГОСТ Р 51417-99. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение массовой доли азота и вычисление массовой доли сырого протеина. Метод Кьельдаля [Госстандарт Р 51417-99]. М., 2002.
3. Егорова Т. А. Влияние пробиотиков на основе *Saccharomyces sp.* и *Bacillus subtilis* на бактериальное сообщество слепых отростков кишечника и продуктивность цыплят бройлеров / Т. А. Егорова, Т. Н. Ленкова, Л. А. Ильина, Е. А. Йылдырым, И. Н. Нико-

нов, В. А. Филиппова, Г. Ю. Лаптев, Н. И. Новикова, А. А. Грозина, В. А. Манукян, В. И. Фисинин, И. А. Егоров // *Сельскохозяйственная биология*. 2016. Т. 51. № 6. С. 891–902.

4. Иванова В. С. Методические рекомендации по контролю за развитием молодняка птиц, разводимых в искусственных условиях. / В. С. Иванова, Н. Н. Трошкина. М., 1986.

5. Лобанок А. Г. Дрожжи как основа биологически активных кормовых добавок про- и пребиотического действия / А. Г. Лобанок, Л. И. Сапунова, Н. А. Шарейко, Е. А. Долженкова // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук*. 2014. № 1. С. 17–22.

6. Миколайчик И. Н. Влияние дрожжевых пробиотиков на переваримость питательных веществ рациона и уровень молочной продуктивности коров / И. Н. Миколайчик, Л. А. Морозова, И. В. Арзин // *Молочное и мясное скотоводство*. 2017. № 7. С. 28–32.

7. Руденко А. О. Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот. / А. О. Руденко // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2009. № 10(2). С. 24–32.

8. Рыжакина Т. П. Влияние дрожжевых продуктов на молочную продуктивность коров / Т. П. Рыжакина, Ю. А. Воеводина, С. В. Шестакова М. В. Механикова, Т. В. Новикова, В. А. Механиков // *Молочнохозяйственный вестник*. 2018. № 4 (32). С. 36–45.

9. AlZahal O. Factors influencing ruminal bacterial diversity and composition and microbial fibrolytic enzyme abundance in lactating dairy cows with a focus on the role of active dry yeast. / O. AlZahal, F. Li, L. L. Guan, N. D. Walker, B. W. McBride. // *J. Dairy Sci.* 2017. Vol. 100. №6. P. 4377–4393.

10. Aung H.-P. In-capillary derivatization with o-phthalaldehyde in the presence of 3-mercaptopropionic acid for the simultaneous determination of monosodium glutamate, benzoic acid, and sorbic acid in food samples via capillary electrophoresis with ultraviolet detection / H.-P. Aung, U. Pyell // *Journal of Chromatography A*. 2016. Vol. 1449. P. 156–165.

11. Molnár-Perl I. Stability and characteristics of the o-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents and their amino acid derivatives measured by high-performance liquid chromatography / I. Molnár-Perl, A. Vasanits // *Journal of Chromatography A*. 1999. Vol. 835. P. 73–91.

КАК ОФОРМИТЬ ПОДПИСКУ НА ЖУРНАЛ?

А. Через подписной каталог

Индекс в каталоге «Газеты. Журналы» Агентства «Роспечать» – **33184**

Б. Через редакцию журнала

Банковские реквизиты для оплаты подписки по безналичному расчету для юридических лиц:

ЧОУДПО «Институт Ветеринарной Биологии»
ИНН 7802196720 КПП 781301001

Р/с 40703810400000000022 в АО «Горбанк», г. Санкт-Петербург

К/с 30101810200000000814 БИК 044030814

В поле «Назначение платежа» указать:

«Предоплата за подписку на журнал «Актуальные вопросы ветеринарной биологии» на 2020 г. согласно инф. письму б/н от 03.09.18 г. НДС не облагается. Адрес подписки: ...»

Стоимость редакционной подписки на 2020 год:

2400 рублей.

Адрес редакции: Санкт-Петербург, ул. Ораниенбаумская, 3-Б.

Т./ф. (812) 232-55-92, т. 927-55-92.

E-mail: virclin@mail.ru; www.invetbio.spb.ru