

ВЕТЕРИНАРИЯ И ЖИВОТНОВОДСТВО

УДК 636.085

Н.В. Донкова, С.А. Донков

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЗЕРЕН КРАХМАЛА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ КУЛЬТУРЫ *BACILLUS SP.* ПРИ ПОЛУЧЕНИИ КОРМОВОЙ ПАТОКИ

В статье рассматриваются варианты морфологических изменений в цельных зёрнах пшеничного крахмала под воздействием амилолитических ферментов, выделяемых культурой микроорганизмов Bacillus sp.

Ключевые слова: зёрна крахмала, морфология, культура микроорганизмов *Bacillus sp.*

N.V. Donkova, S.A. Donkov

STARCH GRAIN MORPHOLOGICAL CHANGES UNDER THE INFLUENCE OF *BACILLUS SP.* CULTURE WHEN RECEIVING FODDER TREAACLE

The morphological change variants in wheat starch whole grains under the influence of amylolytic enzymes secreted by the Bacillus sp. micro-organism culture is considered in the article.

Key words: starch grains, morphology, *Bacillus sp.* microorganism culture.

Введение. В животноводстве одной из причин снижения молочной продуктивности, нарушения воспроизводительной функции и увеличения заболеваемости молодняка является несбалансированность рационов и дефицит в них легкоусвояемых углеводов. Источником таких углеводов является крахмалсодержащее сырьё.

Крахмал наряду с целлюлозой является самым распространённым и постоянно возобновляемым биополимером на Земле. Он образуется в каждом новом растении из глюкозы и углекислого газа в результате процесса фотосинтеза. Образовавшийся крахмал у различных видов растений откладывается в виде зёрен (гранул) в различных частях. Так, у картофеля крахмал накапливается в клубнях, а у злаковых растений – в зёрнах. Молекулы крахмала играют роль аккумуляторов энергии солнца, поэтому крахмал относится к запасным веществам.

В желудочно-кишечном тракте животных и человека цельные зёрна крахмала расщепляются под действием амилолитических ферментов слюны и поджелудочной железы, а у жвачных животных, кроме того, расщепление молекул крахмала начинается в преджелудках под действием амилолитических ферментов микрофлоры рубца.

Процесс ферментативного расщепления крахмала идёт с затратой энергии. Образовавшаяся из крахмала глюкоза в силу разности градиентов из кишечника всасывается в кровь. Поступив в клетки органов, глюкоза в присутствии кислорода расщепляется на углекислый газ и воду. Процесс расщепления глюкозы сопровождается выделением энергии, которая используется организмом для синтеза белка и осуществления различных биохимических процессов.

Семена растений, посеянные в землю, также получают энергию для своего роста из глюкозы, которая образуется при расщеплении зерен крахмала. Расщепление крахмала происходит под действием амилолитических ферментов, которые синтезируются клетками зерна. Как только росток выходит на поверхность земли, на него воздействует энергия солнца и у него запускается самостоятельный процесс фотосинтеза, в результате которого образуется глюкоза, необходимая растению для его роста. У растущего растения глюкоза в первую очередь расходуется на построение молекул целлюлозы, а при созревании растения она трансформируется в крахмал, который приобретает форму зёрен. С наступлением осени оставшееся неис-

пользованным крахмалсодержащее растительное сырьё попадает в землю, где зёрна крахмала подвергаются расщеплению ферментами микроорганизмов.

Способность к расщеплению крахмала до глюкозы при помощи амилолитических ферментов распространена у микроорганизмов очень широко, поэтому не приходится говорить о существовании специфических микробов, расщепляющих крахмал. Продуцентами амилолитических ферментов могут быть бактерии, грибы, дрожжи и актиномицеты.

В России разработана биотехнология получения белково-углеводистой кормовой добавки для продуктивных животных из крахмалсодержащего растительного сырья, которая предусматривает измельчение сырья в мокром виде, его термическую обработку и осахаривание крахмала при помощи ферментов микробиального происхождения. Все эти технологические процессы осуществляются в одном аппарате, который называется кавитатор [1]. В процессе заваривания сырья молекулы воды присоединяются к молекулам крахмала, зёрна крахмала набухают и теряют свою структуру – происходит клейстеризация сырья. Заваренный крахмал в отличие от цельных зёрен легче подвергается ферментативному гидролизу. Полное расщепление молекул крахмала до глюкозы при данной технологии происходит за 3–4 ч.

За рубежом к настоящему времени разработана биотехнология, позволяющая с помощью ферментов расщепить зёрна крахмала без их заваривания. Американская фирма Genencor International (DuPont) предлагает для этого комплекс ферментов линии Stargen, которые предназначены для применения в спиртовой промышленности. Преимуществами данной технологии являются увеличение производительности, снижение расходов энергии, сокращение количества технологических операций и оборудования.

Комплекс Stargen состоит из ферментов, которые оказывают синергичное действие на зёрна крахмала. В комплекс входят ферменты альфа-амилазы и глюкоамилазы, которые «просверливают» дырки в крахмальных зёрнах. Эти ферменты выделены из различных видов микроорганизмов. Альфа-амилазы выделены из плесневых грибов *Aspergillus niger*, *Aspergillus kawachi*, *Rhizopus niveus* и бациллы *Bac. polymyxa*. Глюкоамилазы выделены из *Aspergillus niger*, *Humicola grisea* и *Rhizopus oryzae* [2].

Исследования по изучению возможности ферментативного гидролиза крахмала в цельных зёрнах (гранулах) для пищевой промышленности проводятся и на Украине. Результаты исследований, представленные в работе Л.В. Капрельянц [3], показывают, что эффективность ферментативного гидролиза зависит от размеров крахмальных зёрен.

Для получения простых сахаров человек научился из крахмала получать простые сахара в виде различного состава паток. В промышленных масштабах этот процесс осуществляется при помощи минеральных кислот.

Смоченное водой и пророщенное в комнатных условиях зерно называется солодом. При прорастании зерна происходит гидролиз высокомолекулярных соединений с образованием низкомолекулярных продуктов. Такое зерно накапливает ферменты и используется для осахаривания крахмала с целью получения спирта.

Одним из важнейших направлений научно-технического прогресса при получении простых сахаров из крахмала является частичная или же полная замена минеральных кислот и солода ферментными препаратами микробиального происхождения и осахаривания этими ферментами цельных зёрен крахмала. Причём технологии всё более приближаются к воспроизведению физиологических процессов обмена веществ вне организма. Поэтому производство ферментных препаратов является одним из перспективных направлений в биотехнологии, которое будет и далее интенсивно развиваться и расширяться.

Ранее в наших работах были приведены результаты исследований, связанных с применением амилолитических ферментов микробиального происхождения при осахаривании крахмалсодержащего растительного сырья при получении кормовой патоки [4].

Цель исследований. Изучение характера морфологических изменений, происходящих в цельных зёрнах пшеничного крахмала под действием амилолитических ферментов, выделяемых микроорганизмом *Bacillus sp.* при получении кормовой патоки.

Материалы и методы исследований. Культура *Bacillus sp.* была идентифицирована в ВКПМ НИИ генетики г. Москва. Экспериментальные исследования проведены в лаборатории ветеринарной медицины Красноярского научно-исследовательского института животноводства (КрасНИИЖ) Россельхозакадемии.

Получение раствора фермента. Чистую культуру выращивали в чашках Петри на твёрдой питательной среде с агаром. Затем выросшие колонии смывали с агара дистиллированной водой и вносили в стерильную накопительную среду, которая содержала заваренные пшеничные отруби. Жидкую питательную среду на три дня помещали в термостат при температуре 39°C. За это время в питательной среде происходило накопление культуры и соответственно фермента.

Далее в колбу объёмом 50 мл помещали навеску зёрен пшеничного крахмала в количестве 1 г и заливали культуральной жидкостью в объёме 10 мл. Колбу помещали в термостат при температуре 39°C.

Контролем служила аналогичная колба с крахмалом, замоченным дистиллированной водой.

В течение всего опыта производили микроскопические исследования, во время которых оценивали состояние зёрен крахмала и характер происходивших в них морфологических изменений. Для проведения микроскопии пипеткой брали одну каплю культуральной жидкости с крахмальной взвесью и помещали её на предметное стекло. Для окрашивания зерен крахмала применяли раствор Люголя. Микроскопию проводили при объективе микроскопа с кратностью увеличения 10×.

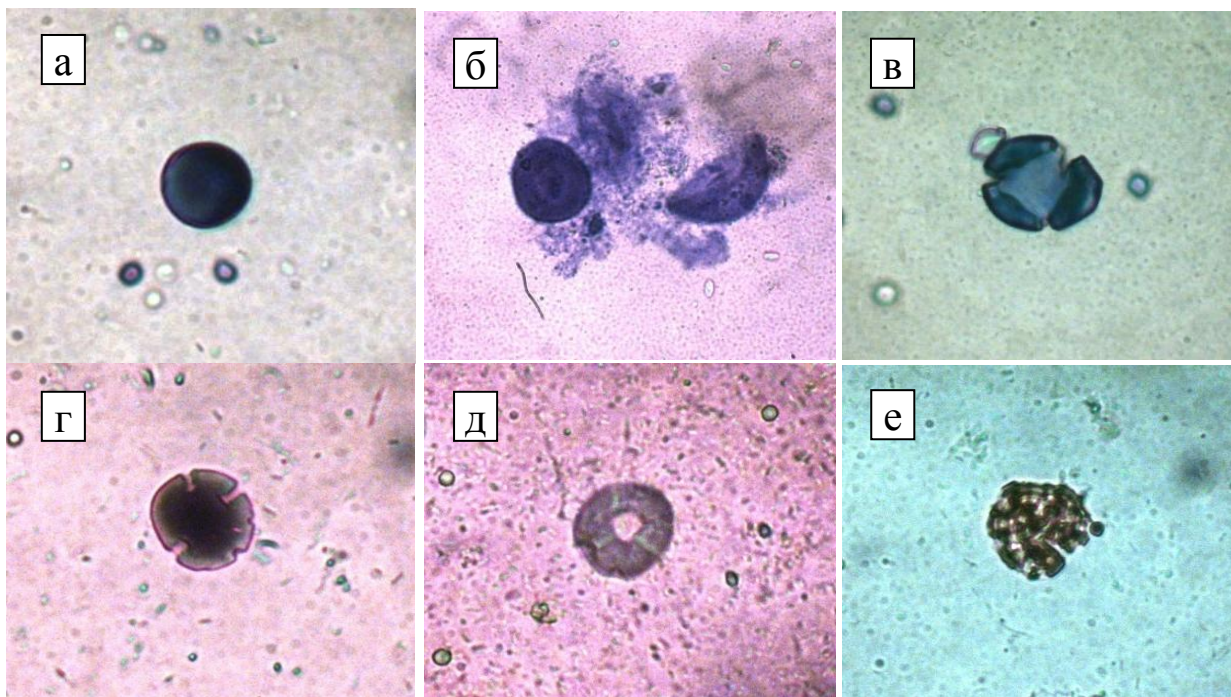
Общее количество крахмальных зёрен и количество зёрен с изменённой структурой подсчитывали в камере Горяева.

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, заложенных в электронных таблицах Ms.Excel.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведённых исследований установлено, что в зёрнах крахмала под действием амилолитического фермента, выделяемого *Bacillus sp.*, происходили разнообразные морфологические изменения. Нами выделены пять видов морфологических изменений, при этом в каждом зерне проявлялся только один из пяти видов изменений.

На представленных микрофотографиях (рис.) приведены основные виды морфологических изменений в зёрнах крахмала, которые наступали под действием амилолитических ферментов культуры микроорганизмов *Bacillus sp.*



Виды морфологических изменений зёрен пшеничного крахмала, происходящие под действием амилолитических ферментов Bacillus sp.: а – зерно крахмала в норме; б – резкий разрыв зерна; в – раскрывающийся бутон; г – сморщивание; д – образование дырки в центре зерна крахмала (бублик); е – образование в зерне множества дырок (решето)

Различные виды морфологических изменений в зёрнах крахмала наступали в различное время после воздействия ферментов культуры микроорганизмов *Bacillus sp.*

Данные по относительному количеству видов морфологических изменений в крахмальных зёрнах и времени, в течение которых они происходили, представлены в таблице.

Морфологические изменения зёрен крахмала в течение времени

Вид морфологических изменений зёрен		Процент от общего числа изменений	Время регистрации изменений
Б	Разрыв	53	5-10 мин
В	Раскрывающийся бутон	25	30-60 мин
Г	Сморщивание	10	4-5 ч
Д	«Дырка» в центре (бублик)	7	8-10 ч
Е	Множество «дырок» (решето)	5	12-24 ч

Морфологические изменения в зёрнах крахмала после воздействия ферментов культуры микроорганизмов *Bacillus sp.* характеризовались следующими особенностями:

1) у 53 % зёрен, подвергнутых воздействию фермента, наступал резкий разрыв зерна и зерно исчезало. Такие изменения наступали через 5–10 мин после воздействия ферментов;

2) у 25 % от зерна отделялись крупные части и зерно напоминало раскрывающийся бутон цветка. Зёрна с такими морфологическими изменениями растворялись в течение 1 ч;

3) у 10 % растворение зёрен крахмала начиналось с расщепления поверхностно расположенных молекул крахмала. На их месте образовывались сквозные борозды, которые распространялись с периферии к центру зерна. Зерна сморщивались и исчезали в течение 4–5 ч;

4) у 7 % расщепление молекул крахмала начиналось в центральной части зерна. В центре зерна образовывалась «дырка» и зерно крахмала становилось похожим на бублик, сквозь центральную «дырку» можно было наблюдать нижележащие слои. Постепенно «дырка» расширялась и зерно исчезало. Данные изменения с дальнейшим растворением зёрен происходили в течение 8–10 ч;

5) у 5 % расщепление молекул крахмала начиналось одновременно во многих местах крахмального зерна, поэтому в зерне происходило образование множества «дырок». Фермент «просверливал дырки» в зерне и оно становилось похожим на решето. «Дырки» постепенно сливались и зерно исчезало. Этот процесс занимал от 12 до 24 ч.

В итоге все 100 % зёрен крахмала с наличием различных морфологических изменений растворялись в течение 24 ч после воздействия ферментов культуры микроорганизмов *Bacillus sp.*

Заключение. Цельные зёрна пшеничного крахмала под воздействием амилолитических ферментов, выделяемых культурой микроорганизмов *Bacillus sp.*, растворялись с проявлением различных видов морфологических изменений. Эти изменения связаны с расщеплением молекул крахмала, локализованного в различных участках зерна. Наиболее быстро (в течение 5–10 мин) в зёрнах крахмала наступали значительные морфологические изменения в виде их разрыва; мелкие изменения в виде появления множественных «дырок» в зерне наступали гораздо позднее (в течение 12–24 ч).

Литература

1. Технология переработки зернового крахмалсодержащего сырья на кормовые сахара и их использование в животноводстве: метод. руководство /К.Я. Мотовилов, В.В. Аксёнов, В.Г. Ермохин [и др.]. – Новосибирск, 2012. – 32 с.
2. About DuPont Industrial Biosciences [Электронный ресурс]. URL: <http://biosciences.dupont.com/> (21.03.2013 г.).
3. Капрельянц Л.В., Шпырко Т.В., Помазанова Е.Ф. Модификация пшеничного крахмала различными амилазами / Одесская национальная академия пищевых технологий [Электронный ресурс]. URL: <http://www.stattionline.org.ua/index.php/agro/biotehnolog/578-modifikaciya-pshenichnogo-kрахmala-razlichnymi-amilazami.html> (17.03.2013 г.).
4. Донкова Н.В., Донков С.А. Биоконверсия пшеничных отрубей для животноводства: метод. пособие. – Красноярск, 2010. – 61 с.