

ставляет 163,7 %) ($P < 0,01$). Достоверное увеличение линейных размеров всех долей печени отмечается в период от новорожденности до 6,5-месячного возраста за исключением длины сосцевидного отростка, в дальнейшем достоверно увеличивается длина только левой доли.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Акаевский А.И. Анатомия домашних животных. – М.: Колос, 1975. – 563 с.
3. Байматов Н.В. Коррекция морфофункциональных нарушений печени в комплексном хирургическом лечении её токсических поражений: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Горький, 2007. – 24 с.
4. Ван Бэнь, Донкова Н.В. Макро- и микроморфология печени овец тувинской короткожирнохвостой породы // Вестник КрасГАУ. – 2015. – № 2. – С. 185–189.
5. Луценко А.Е., Иргит Р.Ш. Совершенствование тувинской короткожирнохвостой породы овец. – Красноярск, 2005. – 114 с.
6. Скопичев В.Г., Шумилов В.Б. Морфология и физиология животных. – СПб.: Лань, 2005. – 416 с.



УДК 619:616.33-002:636.22/28

Н.В. Донкова, С.А. Донков

ЗАВИСИМОСТЬ СТЕПЕНИ ОСАХАРИВАНИЯ КРАХМАЛА ОТ СТАДИИ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Представлены результаты изучения влияния жизненного цикла амилолитических бактерий на степень осахаривания крахмала. Выделение амило- и глюколитических ферментов бактериями происходит в соответствии с прохождением их жизненного цикла. Созревание и прорастание споры характеризуется выделением в окружающую среду разжижающего крахмальный клейстер фермента (амилолитический фермент). Дальнейшее деление вегетативной формы характеризуется выделением осахаривающего фермента (глюколитического фермента).

Ключевые слова: амилолитические бактерии, крахмал, осахаривание.

N.V. Donkova, S.A. Donkov

THE DEPENDENCE OF THE STARCH SACCHARIFICATION DEGREE ON THE LIFE CYCLE STAGE OF AMYLOLYTIC BACTERIA

The research results of the amylolytic bacteria life cycle influence on the degree of the starch saccharification are presented. The isolation of amylo- and glycolytic enzymes by bacteria is in accordance with their life cycle passing. The spore maturation and germination is characterized by the release into the environment of the enzyme that thins the starch paste (amylase enzyme). Further the division of the vegetative form is characterized by the release of the saccharification enzyme (glycolytic enzyme).

Key words: amylolytic bacteria, starch, saccharification.

Введение. Сегодня рынок предлагает более десятка ферментных препаратов отечественного (Бацелл, МЭК-СХ2, Целловиридин Г20Х) и зарубежного (Кемзайм, Ронозим, Роксозим) производства, как для расщепления крахмала, так и некрахмалистых полисахаридов в растительном сырье [2]. Форма выпуска этих препаратов – порошок или мелкие гранулы. Какие из них наиболее эффективны по своему физиологическому действию и экономичности в конкретных условиях кормовой базы хозяйств, как правило, неизвестно, но в целом установлено, что добавление в комбикорма ферментных препаратов способствует повышению усвояемости сложных углеводов и, как след-

ствие этого, повышает энергетическую ценность зерновых кормов на 10–15 % [3]. Согласно Ю.П. Комарову [1], при добавлении в отруби препарата Ровабио фирмы «Авентис», представляющего собой мультienzимную композицию, уровень ввода отрубей в комбикорма для молодняка и кур можно увеличить до 20–25 %. Ферментные препараты особенно эффективны для молодняка ранних возрастов, когда у него ещё слабо развита собственная система пищеварительных ферментов. Для таких животных необходимо использовать комплексные ферменты протеолитического, целлюлозо- и амилолитического действия.

Интересное решение предлагает отечественная компания «Биотроф» (г. СПб.). Разработанный её сотрудниками препарат Целлобактерин-Т представляет собой комплекс живых бактерий, расщепляющих клетчатку и одновременно выступающих в роли антагонистов по отношению к ряду энтеропатогенных микроорганизмов [4]. В рационах сельскохозяйственных животных и птиц этот препарат замещает две кормовые добавки: кормовой фермент и пробиотик. Как ферментный препарат Целлобактерин-Т повышает усвояемость зерновых: пшеницы, ячменя, ржи, овса, как пробиотический препарат Целлобактерин-Т подавляет развитие патогенных микроорганизмов и способствует формированию полезной микрофлоры в пищеварительном тракте у животных и птиц.

Одним из важнейших направлений современной науки при получении простых сахаров из крахмала и крахмалсодержащего растительного сырья является частичная или же полная замена солода и минеральных кислот ферментными препаратами микробного происхождения. Преимуществом применения ферментов является то, что они более полно осуществляют гидролиз крахмала, их легче дозировать, отсутствуют производственные затраты, связанные с проращиванием зерна. Большим и неоспоримым достоинством ферментов перед химическими катализаторами является то, что они действуют при нормальном давлении, при температуре от 20 до 70 °С, при pH в диапазоне от 4 до 9 и имеют высокую субстратную специфичность, что позволяет в сложной смеси биополимеров направленно воздействовать только на определенные соединения.

Все это свидетельствует, что производство ферментных препаратов микробного происхождения является одним из перспективных направлений в биотехнологии, которое будет и далее интенсивно развиваться и расширяться. Однако следует сказать, что все ферментные препараты, полученные при участии микроорганизмов, с фармакологической точки зрения являются водными экстрактами питательных сред, в которых культивировались те или иные микроорганизмы. Микроорганизмы в различные стадии своего развития выделяют различные ферменты в окружающую питательную среду. Поэтому ферментативный состав препарата зависит от того, на какой стадии развития технической культуры микроорганизмов было остановлено их развитие. При этом различия между ферментными препаратами заключаются как в составе, так и в степени очистки этих питательных сред.

При разработке технологии получения микробных амилолитических ферментов необходимо учитывать цикл развития микробов в питательной среде, так как синтез ферментов и их состав зависят от стадии развития культуры микроорганизмов.

Для того чтобы иметь чёткое представление об участии микроорганизмов в расщеплении крахмала из растительного сырья в рубце у жвачных животных, необходимо изучить зависимость степени расщепления крахмала от стадии жизненного цикла амилолитических микроорганизмов.

Цель исследований. Изучение влияния стадии развития амилолитических микроорганизмов на степень осахаривания картофельного крахмала.

Материал и методы исследований. Исследования по изучению влияния стадии жизненного цикла развития амилолитических бактерий на степень осахаривания крахмала проводили на базе лаборатории ветеринарной медицины Красноярского НИИЖа. Используемые в исследованиях микроорганизмы были выделены из предоставленного нами материала в ФГУП ГосНИИ «Генетика» (г. Москва). Там же микроорганизмы были идентифицированы и установлено, что они продуцируют амилолитические ферменты. Каждому из этих штаммов был присвоен регистрационный номер и дано название: *Bacillus subtilis* №2-amyloplitic, *Bacillus subtilis* №9-amyloplitic и *Bacillus subtilis* №12-amyloplitic. Штаммы были приняты на национальное патентное депонирование во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

В качестве испытуемого сырья использовали картофельный крахмал. Его заваривали до состояния клейстера и засеивали в него навеску из комплекса спор амилолитических бактерий (*Bac. subtilis* штаммы №2, №9 и №12-amylolitic).

Гидролиз крахмала проводили в термостате при температуре 38°C в течение одних суток.

Степень осахаривания крахмала (наличие декстринов и сахаров) контролировали по наличию цветной реакции с 0,02н водным раствором йода и раствором Люголя [5].

Определение биохимического состава гидролизатов проводили в научно-исследовательском испытательном центре по контролю качества сельскохозяйственного сырья и пищевых продуктов Красноярского государственного аграрного университета.

Развитие бактерий наблюдали при помощи микроскопа. Для этого через равные промежутки времени брали каплю клейстера и помещали её на предметное стекло, на неё сверху капали каплю раствора Люголя, перемешивали, оценивали изменение цвета препаратов йода и проводили микроскопирование.

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. Установлено, что лаг-фаза длилась 12 часов, после чего споры начинали прорастать, что характеризовалось появлением из споры палочки. При прорастании споры выделяли фермент, который разжижал крахмальный клейстер. Прорастание спор сопровождалось образованием углекислого газа и, соответственно, появлением пены на поверхности клейстера. Крахмальный клейстер становился жидким как вода. При микроскопировании клейстера в нём обнаруживали короткие палочки (вегетативная форма микроба, предназначенная для размножения), по форме напоминающие сигары с терминальным расположением споры.

Через 14 часов палочки удлинялись, в них накапливалась гранулёза, в которой по мере роста появлялись от 1 до 3 разрывов. Гранулёза является крахмалоподобным веществом, поэтому тело вегетативной палочки хорошо окрашивалось раствором Люголя в тёмно-синий цвет. При большом увеличении видно, что гранулёза не является сплошным образованием, а состоит из отдельных мелких, плотно прижатых друг к другу гранул. Во время роста и деления палочки продуцировали амилолитический фермент, и поэтому происходило полное осахаривание крахмального клейстера.

Схема строения *Bacillus subtilis* представлена на рисунке.

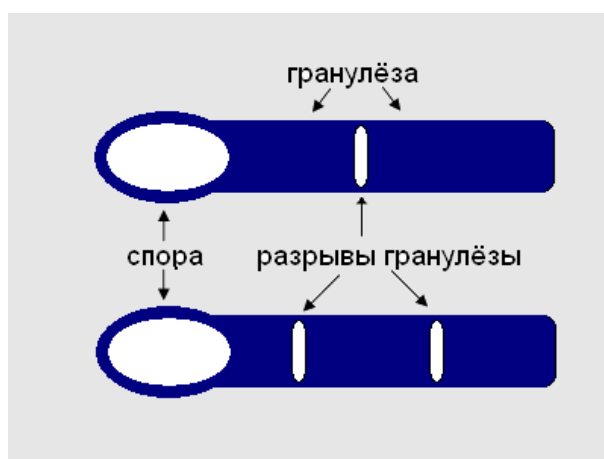


Схема строения *Bacillus subtilis*

Через 18 часов от начала культивирования спора на конце палочки исчезала, а макронуклеус вместе с гранулёзой расходился от центра к противоположным концам палочки. Далее развитие

микробных клеток происходило по одному из двух путей. Одна часть клеток, лишённых 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 часов у дочерних палочек на одном конце вновь 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 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 часа от начала культивирования.

Таким образом, цикл развития амилалитических бактерий состоял из следующих стадий:

1. Спора.
2. Прорастание споры и появление вегетативной палочки.
3. Исчезновение споры у палочки и деление вегетативной палочки.
4. Появление нитей бактерий.
5. Появление на конце дочерней палочки споры.
6. Палочка теряет форму, растворяется, остаётся спора.
7. Нити палочек растворяются.

Цикл развития амилалитической бактерии и количество образующегося сахара из крахмала представлены в таблице 1.

Таблица 1

Образование сахара из крахмала в зависимости от стадии развития амилалитических бактерий

Состояние клейстера	Развитие микроорганизмов		Наличие общего сахара
Крахмальный клейстер	Спора		Нет сахара
Разжижение крахмала	Прорастание споры		Нет сахара
Высокомолекулярные декстрины	Исчезновение споры у палочки		Общий сахар – 1%
Низкомолекулярные декстрины	Деление палочки	Образование нитей	Общий сахар – 2%
Расщепление крахмала до глюкозы и мальтозы	Появление споры у дочерних палочек	Нити растворяются	Общий сахар – 4%
Раствор сахаров			Общий сахар – 6%

Во время своего роста и деления бактерии выделяли в окружающую среду сначала разжижающий фермент, а затем осахаривающий фермент, и амилаза и амилапектин 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 амилапектина до мальтозы и глюкозы изменял свою окраску следующим образом: фиолетовый, сиреневый, розовый, оранжевый, жёлтый и обесцвечивался. Раствор Люголя соответственно окрашивался в цвета: тёмно-синий, гранатовый, тёмно-коричневый, ржаво-коричневый, янтарно-жёлтый.

Тёмно-синий и фиолетовый цвет свидетельствовал, что в растворе присутствуют молекулы крахмала; сиреневый и коричневый цвета – о наличии декстринов; розовый, оранжевый, жёлтый цвета и обесцвечивание – о наличии сахаров.

Результаты исследований, характеризующие наличие цветной реакции крахмала с йодом в зависимости от стадии развития микроорганизмов, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Динамика изменения окрашивания препаратов йода в крахмальном клейстере в зависимости от стадии развития бактерий

Время опыта, часов	Состояние крахмального клейстера	Цвет водного 0,02 н раствора йода	Цвет раствора Люголя	Стадия развития микроорганизмов
12	Обильная крупная пена, снизу пузырьки газа	Фиолетовый	Тёмно-синий	Короткие палочки в виде сигары со спорой
14	Мелкая белая пена, пузырьки газа	Сиреневый	Гранатовый	Длинные палочки со спорой и разорванной гранулёзой
18	Остатки пены, раствор мутный	Розовый	Тёмно-коричневый	Палочки теряют споры и делятся. Палочки теряют споры и образуют нити
20	Нет пены, раствор мутный, на дне незначительный осадок	Оранжевый, жёлтый	Ржаво-коричневый	У дочерних палочек появляются споры
24	Раствор прозрачный, на дне незначительный осадок	Обесцветился	Янтарно-жёлтый	Палочки растворяются, остаются споры

Осахаривание крахмала ферментами бактерий заканчивалось к концу первых суток от начала опыта. К концу суток палочки со спорой начинали бледнеть, истончаться и исчезать, но споры оставались. Споры переходили в неактивную стадию хранения. Они снова становились круглыми, уменьшались в размере, у них исчезал перламутровый зелёный цвет. Другая же часть палочек, которая перешла ранее в состояние нитей, в дальнейшем растворялись без остатка. Готовый раствор сахаров был немного прозрачным, на дне имелся незначительный светло-серый осадок.

Содержание общих сахаров в растворе к концу опыта составляло 5 %. А после выпаривания воды содержание общего сахара в получаемой крахмальной патоке составляло 64 % в пересчёте на сухое вещество.

Заключение. Таким образом, бактерии *Bacillus subtilis* №2-*amylolytic*, *Bacillus subtilis* №9-*amylolytic* и *Bacillus subtilis* №12-*amylolytic* обладают высокой амилалитической активностью.

Уровень осахаривания крахмала зависит от стадии жизненного цикла амилалитических бактерий.

Помещенные в крахмальный клейстер (гель) споры бактерий прорастают, вырабатывая разжижающий фермент, при этом крахмальный клейстер становится жидким как вода. Палочки выде-

ляли осахаривающий фермент, который разрывал гликозидные связи в молекуле крахмала с высвобождением мономера – молекулы глюкозы, которая использовалась как энергетическое вещество для их роста. После окончания роста в бактериях между оставшимися молекулами глюкозы образовывались гликозидные связи, и, соединяясь между собой, молекулы глюкозы вновь образовывали молекулу крахмала, но уже внутри бактерии в виде гранулёзы. При делении палочки на две дочерние гранулёза вместе с макронуклеусом поровну распределялась по противоположным концам палочки. Вместе с генетическим материалом от родительской бактерии передавался и крахмал. При росте дочерней палочки крахмал вновь расщеплялся до молекул глюкозы, которая вновь использовалась для нужд растущего микроорганизма. Но палочка выделяла в окружающую среду фермент с избытком, поэтому из крахмала в окружающей среде накапливалась глюкоза. С повышением концентрации глюкозы свыше 5 % проявлялся её консервирующий эффект. Размножение палочек прекращалось, и они переходили в состояние спор.

Бактерии проходят стадию деления и стадию образования нитей, при этом деление происходит однократно, то есть отсутствует многократное логарифмическое деление, присущее культурам бактерий при их размножении и формировании колонии, что объясняется тем, что сахара являются естественными консервантами.

Выделение амило- и глюколитических ферментов бактериями происходит в соответствии с прохождением их жизненного цикла. Созревание и прорастание споры характеризуются выделением в окружающую среду разжижающего крахмальный клейстер фермента (амилолитического фермента). Дальнейшее деление вегетативной формы характеризуется выделением осахаривающего фермента (глюколитического фермента). Бактерии переводят крахмал из запасной формы в метаболически активные простые углеводы. Культура бактерий способна осахаривать заваренный крахмал до моносахаров, при этом бактерии выделяют как разжижающий, так и осахаривающий экзоферменты.

Литература

1. *Комаров Ю.П.* Разработка математических моделей динамики накопления биомассы бактериальных культур: дис. ... канд. физ.-мат. наук. – Горький, 1983. – 132 с.
2. О развитии технологии сахаристых продуктов из крахмала / *Н.Д. Лукин, В.В. Ананских, Т.В. Липидус* [и др.] // *Пища, экология, качество: тр. VII Междунар. науч.-практ. конф. (Краснообск, 21–22 сентября 2010 г.).* – 2010. – С.147–149.
3. *Сканчев А.И., Сканчева Е.А., Соломейникова Л.В.* Опыт применения пробиотической добавки «Пионер» для повышения продуктивности и сохранности животных // *Био.* – 2005. – № 7. – С. 34–37.
4. *Тарабукин Д.В.* Ферментативный гидролиз как способ повышения питательной ценности трудноусваиваемых компонентов кормов // *Актуальные проблемы биологии и экологии: матлы докл. I Всерос. молодеж. науч. конф.* – Сыктывкар, 2007. – С. 246–249.
5. ГОСТ Р 52060-2003. Патока крахмальная. Общие технические условия. – М.: Изд-во станд., 2003. – 33 с.

