

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ»**

**На правах рукописи**

**МАДЗУ ОНГИЕЛЕ БОРИС**

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ДРОЖЖЕВЫХ  
СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ**

**Специальность: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени кандидата технических наук**

**Научный руководитель:  
доктор технических наук,  
профессор Борисенко Е.Г.**

Москва – 2018 год

## СОКРАЩЕНИЯ

1. ГФ – глубинная ферментация
2. ГТФ – глубинно-твердофазная ферментация
3. КОЕ – колониеобразующие единицы
4. СВ – сухое вещество
5. ТФФ – твердофазная ферментация
6. ПС – питательная среда

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Обзор литературы.....</b>	<b>14</b>
1.1. Селекция микроорганизмов.....	14
1.1.1. Среды накопления микроорганизмов – продуцентов.....	14
1.1.2. Оценки продуктивности отобранных микроорганизмов.....	15
1.1.3. Основные закономерности культивирования микроорганизмов.....	16
1.1.3.1. Способы ферментации микроорганизмов.....	17
1.1.3.2. Преимущества и недостатки глубоинной ферментации.....	18
1.1.3.3. Преимущества и недостатки твердофазной ферментации.....	18
1.1.4. Основные параметры культивирования микроорганизмов.....	19
1.1.4.1. Основные параметры культивирования дрожжей.....	19
1.1.4.2. Основные параметры культивирования бактерий.....	21
1.2. Растительная биомасса как источник продуктов питания.....	24
1.2.1. Углеводы растительной биомассы.....	24
1.2.1.1. Трудноферментируемые углеводы растительной биомассы.....	25
1.2.1.2. Легкоферментируемые углеводы растительной биомассы.....	29
1.2.2. Белки.....	31
1.2.3. Липиды.....	36
1.2.4. Нуклеиновые кислоты.....	38
1.2.5. Олигоэлементы растительной биомассы.....	40
1.3. Взаимосвязь микроорганизмов и растений.....	42
1.3.1. Растительно-микробные взаимодействия.....	43
1.3.2. Растения как центр формирования симбиотических сообществ микроорганизмов.....	44
1.3.3. Влияние регуляторов роста растений на качество получаемой продукции.....	46

1.3.4. Заключение.....	46
<b>2. Экспериментальная часть.....</b>	<b>47</b>
<b>2.1. Материалы и методы исследования.....</b>	<b>47</b>
2.1.1. Сырье, применявшееся в работе.....	48
2.1.2. Реактивы, использованные в работе.....	50
2.1.3. Методы исследования.....	50
2.1.3.1. Методы приготовления питательных сред.....	50
2.1.3.2. Приготовление питательной среды Сабуро.....	50
2.1.3.3. Приготовление питательной среды на основе корнеплодов моркови (морковный агар).....	51
2.1.3.4. Приготовление отрубевого агара.....	51
2.1.3.5. Приготовление питательной среды Эшби.....	51
2.1.3.6. Метод приготовления раствора микроэлементов.....	51
2.1.4. Методы культивирования микроорганизмов.....	52
2.1.5. Приготовление пророщенного ячменя.....	52
2.1.6. Приготовление питательной среды на базе целлюлозосодержащих компонентов для культивирования микроорганизмов при ТФФ.....	53
2.1.7. Метод приготовления стерильных отрубей и рисовой соломы при ТФФ.....	53
2.1.8. Приготовление питательной среды на базе комплексных целлюлозосодержащих субстратов и крахмалистых субстратов при ТФФ.....	53
2.1.9. Приготовление питательной среды на базе комплексных целлюлозосодержащих субстратов и углеводистых субстратов при ТФФ.....	53

2.1.10. Метод глубинного культивирования дрожжей на углеводистых субстратах.....	54
2.1.11. Приготовление питательной среды на базе двухкомпонентных субстратов.....	54
2.1.12. Метод обработки питательных сред перед засевом.....	54
2.1.13. Методы засева микроорганизмов.....	54
2.1.14. Поддержание чистых культур дрожжей и метод приготовления посевного материала.....	55
2.1.15. Поддержание чистых культур бактерий и метод приготовления посевного материала.....	55
2.1.16. Метод выделения и выращивания дрожжей на накопительных питательных средах.....	55
2.1.17. Метод получения чистых культур дрожжей.....	56
2.1.18. Метод отбора дрожжей-суперпродуцентов биомассы на твердофазных субстратах.....	58
2.1.19. Метод конструирования дрожже-бактериальных ассоциаций для биоконверсии растительных субстратов.....	58
2.1.20. Метод приготовления получаемого продукта.....	59
2.1.21. Метод количественного учета дрожжевых клеток в получаемом продукте.....	59
2.1.22. Метод определения содержания микроорганизмов, в том числе бактерий в получаемом продукте.....	60
2.1.23. Определение содержания азота по методу Несслера.....	60
2.1.24. Метод определения аминокислотного состава белков.....	62
2.1.25. Метод определения влажности.....	62
2.1.26. Метод определения рН растворов.....	63

2.1.27. Метод определения ферментативной активности дрожжей.....	63
2.1.28. Метод определения гранулометрического состава.....	63
2.1.29. Методы определения микроэлементов.....	63
2.1.30. Методы определения других элементов.....	64
2.1.31. Метод определения глюкозы и мальтозы.....	64
2.1.32. Испытание получаемого продукта.....	65
2.1.33. Повторность измерений и математическая обработка результатов.....	65
<b>2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>66</b>
2.2.1. Селекция микроорганизмов-суперпродуцентов биомассы.....	66
2.2.1.1. Дрожжевая биоконверсия овсяных отрубей как метод селекции суперпродуцентов биомассы.....	66
2.2.1.2. Продуктивность отобранных штаммов дрожжей на измельченных твердых целлюлозосодержащих субстратах.....	69
2.2.2. Конструирование комплексных питательных сред для твердофазной ферментации в процессе производства получаемого продукта.....	73
2.2.2.1. Использование первичного и вторичного растительного сырья в качестве основы питательных сред.....	73
2.2.2.1.1. Целлюлозосодержащие субстраты как основа твердофазных сред....	73
2.2.2.1.2. Ферментативная активность дрожжей <i>Pichia</i> на растительных субстратах.....	75
2.2.2.2. Влияние злаковых, бобовых и плодово-овощных добавок на рост микроорганизмов при ТФФ.....	76
2.2.2.2.1. Дрожжевая биоконверсия целлюлозно- крахмалистых комплексов....	76
2.2.2.2.2. Дрожжевая биоконверсия целлюлозно-углеводистых комплексов....	79

2.2.2.3. Некоторые физические параметры твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов дрожжами рода <i>Pichia</i> .....	83
2.2.2.3.1. Влияние температуры на рост дрожжей <i>Pichia guilliermondii</i> Ap.....	83
2.2.2.3.2. Влажность целлюлозосодержащих субстратов как фактор стимулирования роста микроорганизмов.....	84
2.2.2.3.3. Влияние перемешивания и аэрации на продуктивность дрожжей.....	86
2.2.3. Глубинные дрожжевые культуры как посевной материал в современном биотехнологическом производстве.....	87
2.2.3.1. Глубинное культивирование дрожжей на гетерогенных углеводистых средах.....	88
2.2.3.2. Последовательное глубинно-твердофазное культивирование дрожжей на комплексных растительных субстратах.....	89
2.2.4. Взаимодействие дрожжей и азотобактера в процессе производства получаемого продукта.....	91
2.2.4.1. Изменение активной кислотности в суспензии при росте ассоциации <i>Pichia guilliermondii</i> Ap и <i>Azotobacter chroococcum</i> Sp на твердофазной среде при аэробном культивировании.....	93
2.2.4.2. Динамика нарастания сырого протеина в продукте.....	94
2.2.4.3. Динамика нарастания аминокислот в продукте.....	95
2.2.4.4. Характеристика продукта, полученного путем биоконверсии.....	96
2.2.4.5. Гранулометрический состав полученного продукта.....	96
2.2.5. Испытание биологически активного продукта на развитии сельскохозяйственных культур.....	97

2.2.6. Физико-химические показатели продукта, полученного из дрожже- бактериальной ассоциации.....	105
<b>3. Выводы.....</b>	<b>107</b>
<b>4. Технологическая часть.....</b>	<b>109</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>114</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>	<b>128</b>

## **Введение**

### **Актуальность темы**

В алиментарной цепи животных и человека базовой субстанцией пищи является растительная биомасса. В желудочно-кишечном тракте растительноядных животных *in vivo* его микробное сообщество расщепляет растительные полимеры, накапливает достаточно значительную микробную популяцию и этот уже микробно-растительный продукт становится основой для образования животной биомассы, биомассы человека и тех вторичных продуктов, которые не используются в организме животного, выделяются в виде навоза – органического удобрения, структурообразователя почвы, являющегося очень важным стимулятором роста растений – базового производителя пищи.

В предшествующих работах МГУПП уже достаточно глубоко изучались вопросы возможной интенсификации микробной биоконверсии растительных материалов *in vitro* с помощью специально отселекционированных дрожжей-продуцентов биомассы с получением новых нутриентов кормового и пищевого назначения. Для этих целей из женского грудного молока выделена культура *Pichia anomala* 9a. Достаточно хорошо изучена в качестве продуцента биомассы на твердых растительных субстратах и служит в качестве эталона продуктивности.

В настоящей работе сделана попытка решить проблему дефицита органических удобрений при сбоях в функционировании крупного промышленного животноводства, что имело место в России в 90-е годы и еще не до конца сглажено сейчас. Подобная проблема весьма актуальна и для целого ряда развивающихся стран, где она формирует еще больший интерес в виде комплексной биоконверсии растительного сырья в пищу, корма и удобрения.

**Цель и задачи исследования:** Целью настоящего исследования являлась разработка технологии новых продуктов микробной биоконверсии растительного сырья, обладающих способностью стимулировать рост растений и тем самым завершить формирование концепции комплексного производства дрожжерастительных нутриентов широкого профиля.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

- продолжить выделение дрожжей из разных биологических субстратов животного и растительного происхождения;
- отселекционировать наиболее перспективные штаммы дрожжей, высокопродуктивные по биомассе при прямой биоконверсии растительного сырья;
- из высокопродуктивных по биомассе дрожжей отселекционировать культуры – активные стимуляторы роста растений;
- изучить продуктивность отселекционированных дрожжевых культур на моно- и полисубстратных твердых питательных средах;
- исследовать механизмы стимулирующего действия дрожже-растительных продуктов на рост растений;
- разработать принципы крупнотоннажного производства дрожже-растительных нутриентов и адаптации их к современным биотехнологическим производствам.

Научные положения, выносимые на защиту:

**Научная новизна работы:**

- установлено, что дрожжи-суперпродуценты биомассы на твердых растительных субстратах могут быть выделены не только из женского грудного молока, но и из других биологических субстратов животного и растительного

происхождения, причем из растительных субстратов суперпродуценты выделяются с большей частотой;

- все отселекционированные дрожжи – активные продуценты биомассы при биохимической и генетической идентификации отнесены к роду *Pichia*;

- штаммы дрожжей *Pichia guilliermondii* Я-1, выделенные из коровьего молока, *Pichia guilliermondii* Ap, выделенные из травяной муки, по своей продуктивности по биомассе на негидролизированных твердых растительных субстратах (соломенная, сенная, травяная мука, измельченное пророщенное зерно или те же целлюлозные субстраты, обогащенные легкоусваиваемыми углеводистыми материалами) практически не отличаются от штамма *Pichia anomala* 9a из женского молока, признанного эталонным по продуктивности;

- штамм дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap отличается тем, что полученная с его помощью твердофазная культура на кукурузном стебле с углеводистыми добавками является активным стимулятором роста ряда сельскохозяйственных культур (салата, и тритикале) и именно его можно рекомендовать для производства препаратов почвенного назначения;

- показано, что в процессе дрожжевой биоконверсии растительного сырья меняется его химический состав, и такой дрожже-растительный обогатитель почвы является хорошим стимулятором роста почвенных бактерий.

### **Практическая значимость результатов работы:**

Сформулированы основные приемы селекции дрожжей-продуцентов биомассы на твердых растительных субстратах.

Определен ряд первичных и вторичных целлюлозосодержащих растительных субстратов, перспективных для микробной биоконверсии: измельченный стебель кукурузы, соломенная, сенная, травяная мука, отруби, пророщенное зерно и т.п.

Для комплексных питательных сред, используемых в твердофазном культивировании дрожжей предложен ряд крахмалистых и углеводистых субстратов, определены параметры культивирования ( $t^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$ ,  $t - 48-72$  ч, влажность 50-60%).

Попытка адаптировать разработанный процесс к уже существующим биотехнологическим производствам коренным образом изменила технологическую цепочку этого процесса. Из углеводистых легкоферментируемых субстратов предложено изготавливать жидкие гетерогенные питательные среды, на которых в стерильных условиях получать жидкие культуры с высокими концентрациями дрожжей и этими высокоактивными посевными материалами увлажнять и засеивать различные твердые растительные материалы. При этом за период короткой (не более 24 часов) твердофазной ферментации дрожжей накапливается даже больше, чем в обычном чисто твердофазном выращивании, твердофазная культура более защищена от посторонней микрофлоры.

Акцент на разработку дрожже-растительных продуктов почвенного назначения в настоящей работе сделан в надежде на то, что такие новые продукты не потребуют многочисленных разрешений, их производство будет развито и на этой производственной базе вторым и третьим эшелонам будут производиться дрожжи – растительные нутриенты как кормового, так и пищевого профиля.

Разработан лабораторный регламент такого производства, он достаточно легко может быть адаптирован к технологической цепочке спиртовых заводов, большинство которых в России не работает. Оптовая цена таких удобрений будет составлять 30149,8руб/т.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были представлены на Общеуниверситетской научной конференции молодых учёных и специалистов “День Науки” (Москва, 2015); на Общеуниверситетской

научной конференции молодых учёных и специалистов “День Науки” (Москва, 2016); на Международной конференции, посвященной 120-летию создания кафедры микробиологии и к 150-летию со дня рождения профессора Н.Н. Худякова “Современные аспекты сельскохозяйственной микробиологии” (Москва, 2016).

**Публикации.** По результатам проведенных исследований опубликовано 6 печатных работ, из них 3 в журнале, рекомендованном ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, библиографического списка, включающего 149 источников. Работа изложена на 149 страницах, содержит 36 рисунков, 23 таблицы и 8 приложений.

## **1. Обзор литературы**

### **1.1. Селекция микроорганизмов**

#### **1.1.1. Среды накопления микроорганизмов – продуцентов**

Для создания оптимальной композиции питательной среды можно ориентироваться на состав клеточного вещества микроорганизмов. Питательная среда должна иметь определенное значение рН, содержать водный раствор или суспензию усвояемых форм углерода, азота, необходимый набор макроэлементов и питательных солей [56,58]. Помимо важнейших элементов и соединений, в состав клеток также входят микроэлементы: молибден, цинк, марганец, медь, бром, бор, йод и др. Соотношение отдельных микроэлементов в среде может сильно колебаться в зависимости от вида микроорганизмов и условий их роста [97].

В зависимости от их консистенции искусственные питательные среды классифицируются на плотные, жидкие и полужидкие [34]. Нередко средами накопления являются сами исходные субстраты, являющиеся источниками выделяемых микроорганизмов. В предшествующих работах кафедры биотехнологии МГУПП в качестве сырья для накопления дрожжевой биомассы были использованы самые различные субстраты как растительного, так и животного происхождения – жидкие, полужидкие и плотные [24, 48, 57, 58, 98]. Причем все эти субстраты в нативном виде могли быть использованы как возможные источники содержащихся в них дрожжей. Так как дрожжи-активные продуценты биомассы обычно являются аэробами, а аэробные условия проще всего создавать в твердофазных культурах, то для формирования элективных пористых твердофазных питательных сред во всех предшествующих работах использовали измельченные и простерилизованные целлюлозосодержащие материалы, которые смешивали с разными нативными материалами – источниками дрожжей, доводили до нужной влажности, инкубировали определенное время при нужном рН и температуре [24,58,98].

Обычно при росте на таких твердофазных материалах микроскопически устанавливалось присутствие дрожжей как качественно, так и количественно. В чистые культуры обычно выделялись дрожжи, наиболее активно растущие на твердых субстратах.

Для активирования роста дрожжей и подавления бактерий, возможных конкурентов этих дрожжей, в твердофазные культуры вводили антибактериальные антибиотики. В качестве наиболее удобной среды накопления для дрожже-продуцентов биомассы в первую очередь могут быть предложены зерновые отруби, как пшеничные, так и овсяные. Что касается бактерий, в качестве питательной среды для их накопления может выступать дрожже-растительный материал [24, 15].

### **1.1.2. Оценки продуктивности отобранных микроорганизмов**

#### **Определение чистоты выделенной культуры**

Чистота выделенной культуры микроорганизмов должна быть тщательно проверена. Это осуществляется обычно несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред. При визуальном контроле просматривается рост микроорганизмов по штриху на поверхности скошенной агаризованной среды. Если рост по штриху неоднороден, культура загрязнена. Такой контроль возможен только для культур, которые способны расти и развиваться на плотных питательных средах. Необходимо чистоту культур микроорганизмов контролировать микроскопированием. Для этого готовят препарат фиксированных окрашенных клеток и просматривают его с иммерсионной системой или делают препарат живых клеток и просматривают его с помощью фазово-контрастного устройства.

#### **Количественный учет микроорганизмов**

Рост микроорганизмов в питательных средах или в естественных субстратах оценивают по изменению количества их клеток или биомассы в

единице объема. Определять эти показатели можно прямыми (подсчет клеток под микроскопом, взвешивание) или косвенными методами. Косвенные методы основаны на измерении параметров, величина которых зависит от количества или биомассы микроорганизмов (число колоний, выросших после посева суспензией клеток на питательную среду, рассеяние или поглощение суспензией света, содержание в ней белка и т.д.). Выбор метода связан с целью исследования, свойствами питательной среды или субстрата, а также с особенностями роста и морфологии микроорганизмов. Так, многие методы, которые используют для определения количества одноклеточных микроорганизмов, не подходят для подсчета многоклеточных. При анализе численности микроорганизмов, в особенности в естественных субстратах (прежде всего в почве), не стоит забывать, что их клетки не редко находятся в прикрепленном состоянии или в виде микроколоний. Следовательно, перед началом подсчета их необходимо разделить с частицами субстрата и друг с другом. Выбор метода десорбции (механическое перемешивание суспензии клеток, растирание, обработка ультразвуком, применение поверхностно-активных веществ и т.д.) связан с особенностями исследуемого субстрата [61].

Макрокультуральный метод или метод Коха является единственным методом, дающим верный подсчет количества живых клеток. Другие методы дают общую концентрацию и мертвых, и живых. Засевают взвесь и считают полученные колонии. Метод достаточно сложный, т.к. необходимо посеять клетки отдельно друг с другом. Приблизительно по стандарту мутности определяют примерную концентрацию. После этого разводят исследуемый раствор до концентрации 1000-2000 клеток на миллилитр. Засевают десятую миллилитра этой суспензии.

Узнав общее число клеток и число живых клеток, можно определить коэффициент жизнеспособности [98].

### **1.1.3. Основные закономерности культивирования микроорганизмов**

### **1.1.3.1. Способы ферментации микроорганизмов**

Глубинная ферментация микроорганизмов протекает во всем объеме жидкой питательной среды, содержащей растворенный субстрат. Ферментер создает условия для роста и развития популяции микроорганизмов в объеме жидкой фазы, доставку питательных веществ к клеткам микроорганизмов, отведение от микробных клеток продуктов их обмена веществ (метаболизма), отведение из среды выделяемого клетками тепла.

Глубинная ферментация может быть непрерывной и периодической.

При непрерывном способе ферментации питательная среда постоянно поступает в ферментер (биореактор), в котором создают оптимальные условия для роста и развития микроорганизмов, а из ферментера (биореактора) в свою очередь постоянно вытекает культуральная жидкость вместе с находящимися в ней микроорганизмами [17, 19, 45].

А при периодическом способе ферментации в ферментер помещают сразу весь объем питательной среды и добавляют посевной материал. Культивирование микроорганизмов ведут в оптимальных условиях в течение определенного времени, затем процесс останавливают, сливают содержимое ферментера и выделяют целевой продукт [25, 27, 38].

Твердофазная ферментация применяется довольно давно и широко во многих странах с тропическим климатом для получения традиционных продуктов [8, 48, 51, 54, 64]. Термин твердофазной ферментации означает выращивание микроорганизмов на нерастворимых субстратах без свободной влаги в системе. Необходимая для процесса ферментации на твердой среде влага находится в сложной форме внутри твердой матрицы [16, 29, 6, 143, 98].

Что касается культивирования аэробных микроорганизмов, то оно может осуществляться на поверхности жидких и плотных сред (кислород поступает в клетки микроорганизмов напрямую из воздуха) или внутри жидкой питательной среды – глубинное культивирование [61].

### **1.1.3.2. Преимущества и недостатки глубинной ферментации**

Способ глубинной ферментации во многом лучше твердофазного метода, так как дает возможность значительно сократить производственные площади, исключить тяжелый непроизводительный ручной труд, создать лучшие условия для гигиены труда, упростить механизацию и автоматизацию производства. При глубинном способе культивирования целесообразнее используются питательные вещества сред, что позволяет существенно сократить отходы производства в виде нерастворимых осадков твердой питательной среды, получать препараты ферментов с уменьшенным содержанием примесей и увеличенной удельной активностью [27, 45, 17].

Недостатком метода является то, что в процессе культивирования приходится работать со сложной трехфазной системой: жидкость – твердая взвесь – газ. В такой системе усложнены массообменные процессы и поэтому затрудняется аппаратное оформление всей стадии выращивания [28].

### **1.1.3.3. Преимущества и недостатки твердофазной ферментации**

Твердофазная ферментация имеет более высокую продуктивность с единицы массы используемого субстрата по сравнению с жидкими питательными средами. Субстрат в данном случае во много раз концентрированнее. ТФФ позволяет избежать сложные и затратные операции, связанные с выделением и концентрированием продукта, сепарированием и вакуум-выпариванием.

После ферментации высокое содержание (40-60%) субстрата и целевого продукта в среде дает возможность существенно снизить энергозатраты на высушивание. Незначительное количество используемой в процессе воды упрощает технологию, делает ее почти безотходной и экологически менее опасной [144, 146]. При производстве ферментов характер субстрата упрощает отделение и очистку продукта. При производстве кормов вся среда и весь продукт ферментации могут использоваться без дополнительной обработки.

Аппаратура, используемая в ТФФ, значительно проще, чем в глубинной ферментации. Сточные воды имеют небольшой объем или полностью отсутствуют. Отсутствует проблема пенообразования. Появляется возможность контролировать небольшое число параметров [48].

ТФФ имеет ряд недостатков. Большая часть микробиологических процессов при ТФФ протекает медленнее. Контроль основных параметров ферментации (рН и т.д.) усложняется из-за нехватки водной фазы, гетерогенности среды, замедленной массопередачи. Некоторые микроорганизмы не могут расти и развиваться в условиях ТФФ [48].

#### **1.1.4. Основные параметры культивирования микроорганизмов**

##### **1.1.4.1. Основные параметры культивирования дрожжей**

**Дрожжи** – одноклеточные лишённые хлорофилла немицелиальные грибы. Их клетки имеют разнообразную форму, иногда форма клетки бывает настолько характерна, что она может являться опознавательным признаком рода. Дрожжевые клетки крупнее по сравнению с бактериями (до 8 – 10 мкм в диаметре), неподвижны. Дрожжи широко встречаются в природе: в верхних слоях почвы, особенно почвы садов, в пыли, на плодах и листьях многих растений [5,101].

Химический анализ сушеных пивных дрожжей низового брожения: 30 – 40% углеводы, 25 – 55% белковые вещества, 2 – 3% жиры, 7 – 12 % вода и 7 – 9% зола, содержащая, в основном, фосфорнокислые и калийные соли [38].

В процессе своей жизнедеятельности дрожжи поглощают углеродистые, азотистые вещества и различные источники зольных элементов (S,P,K,Mg,Fe и др.) [49,59].

#### **Влияние температуры**

Оптимальные температуры для развития дрожжей и проявления их наиболее высокой бродильной активности зачастую не совпадают. Дрожжи,

выращенные при температуре 17 - 22°C обладают большей бродильной энергией. Сбраживание мелассного суслу при температурах выше 30°C негативно сказывается на выходе и качестве выделяемых из зрелой бражки и используемых в качестве хлебопекарных дрожжей. Ферментативная активность, подъемная сила и стойкость этих дрожжей при хранении снижаются, поэтому для выращивания дрожжей и сбраживания мелассного суслу следует придерживаться температурного режима: 28 - 29°C в дрожжегенераторах, 30 - 31°C в двух головных бродильных аппаратах и 28 - 29°C в концевых аппаратах [67].

Естественный свет при 40 - 45°C убивает дрожжи через 4 часа, а при 36°C они погибают через 6 суток. Отсутствие света не мешает развитию дрожжей, а рассеянный свет может снизить скорость их почкования. Искусственное освещение влияет так же, как рассеянный дневной свет. Лучи спектра оказывают различное влияние: красный свет не вреден для дрожжей, синий свет в некоторой степени снижает их жизнедеятельность; ультрафиолетовые лучи уже через 10 секунд останавливают почкование, а при продолжительном воздействии убивают дрожжевую клетку [35].

### **Влияние влажности**

Оптимальная влажность культивирования дрожжей колеблется от 55 до 65% и зависит от состава среды, свойств штамма и влагопоглощительных свойств субстрата. Для зернового сырья, такого как отруби, оптимальным является верхний предел диапазона влажности, так как такое сырье имеет хорошую рыхлость и влагоудерживающую способность, а нижний указанный предел соответствует дробленому зерну (размер 1-3мм). Присутствие свободной влаги при ТФФ уменьшает перенос кислорода к клеткам дрожжей и ведет к активному размножению посторонней микрофлоры [11].

## **Влияние рН**

Жизнеспособность дрожжей сохраняется при рН среды от 2 до 8; для их культивирования оптимальным является рН 4,8 – 5. При рН ниже 4,2 дрожжи продолжают развиваться [67].

При ТФФ в силу большей буферности среды и малой влажности среды рН почти не изменяется. Это значительное отличие между твердофазным и глубинным культивированием [20].

## **Влияние кислорода**

Для обеспечения нормального размножения дрожжей, среду аэрируют большим количеством воздуха (100 – 120м<sup>3</sup>/ч воздуха на 1м<sup>3</sup> среды) [26].

В присутствии кислорода дрожжи интенсивно растут и размножаются, используя углеводы на формирование своих клеток. В анаэробных же условиях они размножаются мало, но зато интенсивно сбраживают углеводы, образуя в основном этиловый спирт и углекислый газ. При брожении формируются и промежуточные продукты (уксусный альдегид, пировиноградная кислота и др.) [35].

### **1.1.4.2. Основные параметры культивирования бактерий**

Все известные науке бактерии разделяют на архибактерии (т.е. древние бактерии) и эубактерии (к которым относится большинство современных их видов). Бактерии по размеру больше вирусов, но меньше эукариотной клетки, большинство из них можно исследовать с помощью светоптической микроскопии. Прокариотная природа бактерий была выявлена к середине XX в. [79].

## **Влияние температуры.**

Температура является одним из главных факторов, определяющих развитие микроорганизмов. Они могут расти и проявлять свою жизнедеятельность в конкретном температурном диапазоне [15].

По оптимальной температуре культивирования бактерии разделяют на три группы: термофилы, мезофиллы и психрофилы. Оптимальная температура культивирования термофилов составляет 50 – 60°C. Поэтому термофилы не составляют интереса для медицинской микробиологии.

подавляющее большинство бактерий, используемых в медицине, лучше всего растут при температуре 37°C, близкой к температуре человеческого организма. Эти бактерии называются мезофиллами [98].

## **Состав питательной среды**

Среды для развития бактерий должны содержать необходимые для построения белков цитоплазмы элементы: азот, углерод, водород, неорганические соединения, содержащие фосфор, калий, серу, натрий, магний, железо, а также микроэлементы: кобальт, йод, марганец, бор, цинк, молибден, медь и др. Все перечисленные выше элементы должны присутствовать в питательной среде в форме, удобной для усваивания их микроорганизмами, причем требования различных микробов в этом отношении различны.

Также бактерии нуждаются в неорганических элементах. Ими служат такие соли, как NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и т.д. Микроэлементы играют роль катализаторов химических процессов, требуются в очень малых количествах и поступают в питательную среду с пептоном, неорганическими солями и водой.

Источником факторов роста служат добавляемые к питательной среде продукты растительного и животного происхождения, содержащие в своем составе никотиновую, парабензойную кислоты, витамины и др. [14].

### **Влияние влажности.**

Минимальная влажность субстрата для бактерий, при которой они еще имеют способность развиваться – 20 – 30%, для мицелиальных грибов – 11 – 13%, т.е. они могут расти на мало увлажненных субстратах [15].

### **Влияние pH**

Большая часть бактерий лучше всего растет при pH, близком к 7. В естественных условиях прокариоты (бактерии) могут развиваться в диапазоне pH от 1 до 11. По отношению к pH среды их можно классифицировать на: нейтрофилы, ацидофилы и алкалофилы.

Нейтрофилы выбирают нейтральную реакцию среды, оптимальный pH для их роста составляет 6,8 – 7,3, минимальный – 4, максимальный – 9. Подавляющее большинство бактерий являются нейтрофилами.

Для ацидофилов (кислотолюбивых) оптимальное значение pH – 4 и ниже.

Для алкалофилов (щелочелюбивых) оптимальное значение pH – 9 и выше.

Споры бактерий как правило более устойчивы к изменениям pH, чем вегетативные клетки [15, 61].

### **Влияние кислорода**

Кислород является одним из ведущих факторов среды обитания микроорганизмов. Он нужен как для конструктивного, так и для энергетического обмена микроорганизмов. Практически все микроорганизмы используют кислород для обмена веществ как в связанном состоянии, так и молекулярный кислород, но существуют и такие микроорганизмы, для которых молекулярный кислород не нужен, следовательно, конструктивные и энергетические процессы у них происходят без участия кислорода, то есть они являются строгими анаэробами [15].

## **1.2. Растительная биомасса как источник продуктов питания**

### **1.2.1. Углеводы растительной биомассы**

В растительной биомассе содержатся многие вещества. Для пищевой биотехнологии химический состав растений играет большую роль, им определяется способ переработки сырья и пути его дальнейшего использования в пищевых производствах [73,92].

Клетка является основной структурной единицей всех живых организмов. Поэтому химический состав живых организмов стоит изучать на клеточном уровне [60,111].

Химический состав и структура клеточной стенки характеризуют ее важнейшие свойства, такие, как прочность, эластичность, высокая гидрофильность. Основой химического состава клеточной стенки являются полисахариды. Основную долю массы растений составляют клеточные стенки. Это сказывается на химическом составе целого растения. Так, в зрелом растении кукурузы углеводов содержится 83,3 % от сухой массы, белки – 8,7%, липиды – 2,3%, зола - 5,7 % [62,73].

Клеточные стенки могут быть первичными и вторичными. Средний состав первичной клеточной стенки имеет такой вид: целлюлоза – 25% от сухой массы, пектиновые вещества – 30%, гемицеллюлозы – 40%, белки и другие вещества – 5 %. Вторичная клеточная стенка имеет большую плотность и отличается по химическому составу от первичной. Одним из основных ее компонентов является целлюлоза. В зависимости от функций клеток конкретных тканей доля целлюлозы может возрасти до 60% и более. Помимо того, вторичная клеточная стенка может содержать вещества, которые усиливают изолирующие свойства и прочность, такие, как лигнин, суберин, минеральные соли. Некоторые растительные ткани состоят из клеток, имеющих третичную клеточную стенку, образующуюся с внутренней стороны вторичной и обладающую специфической структурой. Эта оболочка преимущественно состоит из ксилана [60,58].

### **1.2.1.1. Трудноферментируемые углеводы растительной биомассы**

Основной составной частью растительного сырья служат углеводные компоненты – полисахариды, количество которых в различных видах сырья варьируется от 40 до 75% [60,87,94].

Термин «пищевые волокна» появился при изучении компонентов растительных клеток и их использовании в лечебных диетах. Пищевые волокна – это большая группа веществ различной химической природы, в состав которой входят клетчатка (целлюлоза), гемицеллюлоза, гумми (камеди), пектины, а также крахмал и лигнин, который не является углеводом [39,83].

Растения служат источниками пищевых волокон, которые объединяют неперевариваемые углеводы (клетчатка, пектин, гемицеллюлоза, инулин, гумми, слизи). Пищевые волокна могут улучшать моторику желудочно-кишечного тракта, сорбировать тяжелые металлы, радионуклиды и выводить их из организма, снижать уровень холестерина в крови и пр. Этим обусловлена их роль в питании человека [39,66,58].

Крахмал, пектиновые вещества, клетчатка используются в производстве пищевых продуктов в качестве структурообразователей. Пектин выделяют из сахарной свеклы, фруктов и ягод. Источниками клетчатки являются стебли, листья, плоды растений. Растения, содержащие инулин, используются для получения фруктозы, которая используется как заменитель сахарозы в питании страдающих сахарным диабетом людей [49,94].

Растительные ткани однолетних и многолетних растений состоят в основном из полисахаридов 60-70%, лигнина 20-28% и незначительного количества экстрактивных и минеральных веществ [78].

#### **Углеводный состав некоторого растительного сырья:**

*Сахарный тростник* содержит 40,0% целлюлозы; 20,4% гемицеллюлозы; 24,5% лигнина и 2,6% зольных веществ.

*Кукурузная лужга* содержит 33,5% целлюлозы; 37,7% гемицеллюлозы; 15,1% лигнина и 1,3% зольных веществ.

*Пшеничная солома* содержит 39,% целлюлозы; 23,4% гемицеллюлозы; 24,5% лигнина и 5,9% зольных веществ.

*Рисовая лузга* содержит 29,0% целлюлозы; 18,1% гемицеллюлозы; 19,0% лигнина и 16,0% зольных веществ.

*Хлопковая шелуха* содержит 41,5% целлюлозы; 26,4 % гемицеллюлозы; 28,0% лигнина и 2,8% зольных веществ.

*Верховой торф* содержит 20-24% целлюлозы; 16-36% гемицеллюлозы [67].

*Целлюлоза* является самым распространенным веществом на планете, она образуется в количестве 100 млрд тонн в год за счет фотосинтеза. Целлюлоза служит основным компонентом клеточных оболочек растений и содержится в древесине, семенных оболочках многих однолетних растений, в морских и пресноводных водорослях. Содержание целлюлозы во всех этих растительных тканях может быть различным. Наиболее чистый вид природной целлюлозы – волоски хлопковых семян, которые содержат только 2% нецеллюлозного вещества. Во льне и рами содержится 80-90% целлюлозы, а в джуте – 65-75%. В древесине содержится 40-50% целлюлозы в зависимости от породы. В химическом отношении целлюлоза является полимером  $\beta$ -D-глюкозы, молекулы которой связаны между собой 1-4-гликозидными связями со степенью полимеризации 8000-12000 [13, 19,74, 89, 87].

*Гемицеллюлозы* представляют собой большую группу высокомолекулярных полисахаридов, которые растворяются в щелочных растворах. Гемицеллюлоза в большом количестве находится в одревесневших частях растений: соломе, семенах, орехах, древесине, кукурузных початках и в отрубях [35,59,114]. Листья и стебли быстро растущих растений содержат от 5 до 85 % гемицеллюлоз, листовенная древесина 24-40%, а хвойная 25-35%, в бумажных отходах содержится 10-20% гемицеллюлоз [89].

Гемицеллюлоза состоит из таких моносахаридов, как глюкоза, галактоза, ксилоза, арабиноза, манноза, фруктоза [13,19,81,87,96]. В состав некоторых гемицеллюлоз входят остатки уроновых кислот. Среди гемицеллюлоз встречаются как гомополимеры (глюкан, галактан), так и гетерополимеры

(арабиноксилан, ксилоглюкан, фукогалактоманнан и др.). Большая часть гемицеллюлоз имеет нерегулярное строение, содержит разветвленные участки. Эти особенности структуры обуславливают более высокую растворимость гемицеллюлоз в воде по сравнению с целлюлозой [13,60,96].

Водорастворимые маннан и галактан выделяются мицелием плесневых грибов, принадлежащих к роду *Penicillium*. Маннаны широко распространены в природе. Они содержатся в хвойных деревьях (до 11% от сухой массы), в водорослях, в клубнях многих растений и др. [87,58].

*Ксиланы* в большом количестве содержатся в соломе злаков (30%), в отходах производств по переработке сельскохозяйственных растений, в лиственной древесине (20-25%), в жмыхе сахарного тростника (багасса – до 30%). Основной структурный элемент ксиланов – линейный или слегка разветвленный полисахарид, образованный остатками  $\beta$ -ксилопиранозы, соединенными между собой 1,4-связями [60,87].

*Ксилоглюканы* представляют собой разветвленные полимеры. Сильно разветвленные молекулы ксилоглюкана не соединяются с целлюлозой и могут существовать в свободном состоянии. Во время развития растения и индивидуальной растительной клетки меняется фракционный состав ксилоглюкана, прочность его связи с другими полисахаридами. Эти изменения происходят в присутствии ферментной системы растения [87].

*Глюканы* являются одними из самых распространённых полисахаридов, их представляют крахмал, гликоген, целлюлоза (клетчатка), лихенин, каллоза [143]. Глюканы также входят в состав зерна злаков. Содержание глюканов в зерне без оболочек составляет для пшеницы 0,6 %, ячменя 3,8-4,5%, овса 3,9%, ржи 2,2- 2,6%; в эндосперме этих злаков – соответственно 0,3%; 3,7-4,5%; 1,4-2,3% и 1,5- 2,0 % [60].

*Фруктозаны* представляют собой полисахариды, построенные путём конденсации молекул  $\beta$ -фруктофуранозы. К фруктозанам относится полисахарид инулин. При гидролизе инулина получается фруктоза. Фруктозаны встречаются в растениях. В луговых травах их содержание может

достигать 12-15%. Из растений с высоким содержанием фруктозанов получается хороший силос благодаря обилию фруктозы, способствующей молочнокислому брожению, подавляющему гнилостные процессы [30,62].

*Пектиновые вещества* – комплекс кислых и нейтральных углеводных веществ. Состав и структура многих пектиновых веществ ещё до конца не изучены. Установлено, что линейная часть молекул пектиновых веществ является чередующимися участками D-галактоуронана и рамногалатуронанов. В состав боковых цепей входят нейтральные сахара: арабинозы, галактозы, ксилозы, маннозы, фруктозы и другие [87,95]. Пектины делят на нерастворимые, растворимые, пектиновую кислоту и пектовую кислоту. *Пектиновые вещества* в большом количестве содержатся в ягодах, фруктах, клубнях и стеблях растений. [13,58].

Содержание пектиновых веществ в растительных материалах находится в широких пределах: от 0,1 – 0,5 до 50 %. Наибольшее содержание пектина в лимонных выжимках (30–35 %), в апельсиновых и мандариновых отжимах (25–30 %), околоплодниках подсолнечника (около 25 %), свекловичном жоме (20–25%), яблочных выжимках (5–15%). Пектиновые вещества в различных частях растений размещены неравномерно. Так, в цитрусовых плодах большая часть пектинов сосредоточена в альbedo, в яблоках – в эпидермисе, колленхиме и прилегающих тканях, в сахарной свекле – в мякоти [2].

*Камеди* представляют собой полисахариды, которые выделяются в виде вязких растворов и образуют стеклообразную массу при повреждении коры многих растений. В растениях камеди образуются в процессе перерождения клеточных стенок, содержимого клеток и межклеточного вещества, а иногда и целых участков тканей. К наиболее известным растениям, содержащим камеди, относятся бобовые, розоцветные и др. Камеди собирают в виде твёрдых кусков. Камеди водорастворимы и не растворяются в спирте [87].

*Слизи* представляют собой группу коллоидных полисахаридов, к которой относятся растворимые в воде углеводы, образующие крайне вязкие и клейкие растворы. Типичными представителями этой группы являются гумми, которые

выделяются в виде наплывов вишневыми, сливовыми и другими деревьями в местах повреждения стволов и ветвей [13,30]. К лекарственным растениям, содержащим слизистые вещества, можно отнести льняное семя (5-12%), салеп (до 50%), подорожник и др. Слизь получают извлечением водой. Они широко применяются в медицине, фармацевтике и пищевой промышленности, в производстве бумаги, текстильных изделий и т.д. [87].

*Лигнин* является продуктом растительного происхождения, наиболее устойчивым и широко распространенным органическим полимером в природе и занимает второе место после целлюлозы [60]. Лигнин есть не во всех растениях. В низших растениях, таких, как водоросли и грибы, лигнина нет. В то же время лигнин является неотъемлемой составной частью высших растений. Можно подчеркнуть, что наличие лигнина является признаком высокой степени развития растений. Древесина хвойных пород содержит 25-30% лигнина, а древесина лиственных пород 20-22%. Содержание метоксильных групп в лигнине хвойных пород древесины составляет 15-16%, а лиственной 20-21,5% [87].

#### **1.2.1.2. Легкоферментируемые углеводы растительной биомассы**

Легкоферментируемые углеводы представляют собой фракции углеводов, расщепляющиеся в пищеварительном тракте без значительных энергетических затрат. К ним относятся растворимые в воде и не растворимые углеводы не высокой и высокой молекулярной массы, такие, как моно- и олигосахариды – глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза, лактоза, целлобиоза и другие низкомолекулярные представители, а также полисахариды: крахмал, инулин, гликоген. Все указанные формы углеводов представляют собой резервные источники энергии и пластического материала для самих растений. Поступая с пищей, указанные химические вещества используются организмом для энергетических нужд и на синтез других химических соединений [58].

Моносахариды: Глюкоза  $C_6H_{12}O_6$  является самой распространенной из моноз. Она содержится в свободном виде во всех зеленых частях растений, в семенах, различных фруктах и ягодах (в винограде до 8%, в сливе, черешне 5-

6%). Большое количество глюкозы содержится в винограде, это обуславливает ее название – виноградный сахар. Фруктоза  $C_6H_{12}O_6$  содержится во всех зеленых растениях, в нектаре цветов, и в особенно большом количестве в плодах (например, в арбузе содержание моно- и дисахаридов 6-12%, в том числе глюкоза – 2,4%, фруктоза – 4,3%). Глюкоза и фруктоза легко сбраживаются дрожжами [62,83,105].

Сахароза, мальтоза, лактоза и целлобиоза ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) относятся к группе дисахаридов. Они легко сбраживаются дрожжами. Мальтоза (солодовый сахар) в свободном состоянии в растениях содержится в малом количестве, но появляется при прорастании. Лактоза тоже мало встречается в растениях. Целлобиоза обнаружена в пасоке ряда деревьев. Сахароза широко распространена в растениях, это главный пищевой сахар, особенно много сахарозы содержится в корнеплодах свеклы (14-20% СВ) и в стеблях сахарного тростника (массовая доля сахарозы 14-25%) [60,168]. В мелассе (отход производства сахара) содержание сахарозы 45-50% от сухих веществ. В тростниковой мелассе содержание сахарозы составляет 22%, инвертного сахара – 30% [58,87]

При участии фермента–фруктофуранозидазы сахароза гидролизуется, образуя смесь глюкозы и фруктозы (инвертный сахар). Сахароза очень хорошо сбраживается дрожжами. В пищевой промышленности сахарозу главным образом получают из сахарной свеклы и сахарного тростника [30,104].

Главный усваиваемый углевод в питании человека – это крахмал (примерно 80% всех потребляемых человеком углеводов) [39,60]. *Крахмал* – резервный полисахарид растений, состоящий из большого числа остатков D-глюкозы (до 300). Он является одним из основных полисахаридом пищи, поставщиком глюкозы в организм человека [43]. Крахмал в больших количествах содержится в эндосперме злаковых культур 65-85% его массы, а также в картофеле (до 20%) [105].

### 1.2.2.Белки

Белок является важнейшим компонентом всего живого, он содержится в каждой клетке. Белок незаменим в питании человека и животных. Основным источником пищевого и кормового белка являются высшие растения [43]. Содержание белков в различных растениях варьируется в широких пределах (табл.1). В вегетативных органах культурных растений (стеблях, листьях, корнях, клубнях и т. п.) белки составляют 5-10 % сухой массы, в зернах злаковых культур (ячмень, пшеница, рожь, кукуруза и др.) 10-20 %, в зернах бобовых и масличных культур (горох, подсолнечник, соя и др.) 25 - 35 % сухой массы. Массовая доля азота в белках может составлять 15% и даже более [33,44,60,62,73,83,84].

Таблица 1. Массовая доля простых белков в некоторых растениях и их тканях [30,104,105]

Растение	Массовая доля суммарного белка, %СВ	Содержание в %			
		Альбу-мины	Глобу-лины	Прола-мины	Глюте-лины
Кукуруза	7-13	Следы	5-6	50-55	30-45
Клещевина	17-30	10	90	Следы	Следы
Соя	26-45	1-3	95	Следы	Следы
Пшеница	10-20	3-5	6-10	40-50	30-40
Рис	8-10	5	15	10	70
Подсолнечник	13-19	22	65	0	19
Сахарная свекла	0,2-0,6	10	32	0	58
Лук	6-14	Следы	77	6	15
Капуста	0,2	24	56	7	13
Огурец	0,6-0,9	11	85	0	4

В семенах белка содержится больше, чем в вегетативных органах, сочных ягодах и плодах. Главной причиной этого является содержание воды в органах: в семенах 5-15%, а в корнях, листьях, плодах 70-95% [44,104,105].

Потребность человека в белке удовлетворяется на 57% благодаря белку зерновых культур, на 23% за счет белка клубневых и бобовых культур,

животный белок составляет 20% потребляемого белка. Белок зеленых листьев применяется в питании человека. Зеленая масса растений является ценным источником белка. В сухом веществе биомассы кориандра содержится 61, амаранта – 58, лебеды – 57, клецвины– 37-41, тыквы– 35, капусты и сои –24, люцерны 16-22, салата-латука – 21% белка. Белок получают из сока измельченной зеленой массы. В соке различных растений содержание белка составляет от 12 до 33% к сухим веществам, в белковых препаратах из сока от 50 до 90%, в зависимости от технологии выделения последних [44,58].

Белки и их производные являются важной составной частью каждого живого организма, им принадлежит главная роль во всех процессах и жизненных явлениях. В первую очередь, белки выполняют структурную функцию. Доказано, что более половины сухой массы цитоплазмы и ее органелл приходится на белки, основа строения клетки – биологические мембраны – также наполовину построены из белков. По своей химической природе белками являются все ферменты, катализирующие химические реакции в клетке [60].

Белки предоставляют организму необходимую энергию. При окислении 1 г белка освобождается около 16,8 кДж энергии. Калорийность других веществ, которые откладываются в запас в растительных клетках, кДж/г: глюкоза – 15,5, крахмал – 17,6, жиры – 38,2. Пищевая ценность белков обусловлена наличием в них незаменимых аминокислот. Особенно ценны незаменимые аминокислоты, содержащие много азота, – лизин, аргинин, триптофан [73,93].

Растения способны синтезировать все аминокислоты, входящие в состав белков. Организм человека и животных не может синтезировать все необходимые для синтеза белков аминокислоты. Аминокислоты, не синтезируемые организмами человека и животных, но входящие в состав их белков, называются незаменимыми или обязательными аминокислотами. Для человека такими незаменимыми аминокислотами являются 10 аминокислот [104,105].

*Валин* – В свободном виде содержится в семенах и проростках зерна и семян. Встречается, как правило, в меньших количествах, чем другие аминокислоты.

*Триптофан* – Встречается в относительно малых количествах.

*Треонин* – Там же, встречаются в виде фосфорных эфиров

*Лейцин* – Встречается в больших количествах в белках некоторых растений. В свободном состоянии найден в люпине, тыкве, фасоли, семенах акации и вишни.

*Изолейцин* – В свободном виде обнаружен в мелассе свеклосахарного производства.

*Лизин* – Содержится в небольших количествах в некоторых растениях.

*Аргинин* – Широко распространен в свободном состоянии в люпине (3-5%), тыкве, капусте, люцерне, фасоли, горохе, клещевине, пшенице и других растениях.

*Метионин* – Источник  $-CH_3$  групп в организме при синтезе пектиновых веществ, лигнина, никотина, гордеина ячменя, холина.

*Гистидин* – Путь синтеза в растениях неизвестен.

*Фенилаланин* – В свободном виде обнаружен в семядолях и стеблях, но в малом количестве.

В процессе прорастания семян запасные белки распадаются на аминокислоты, из которых затем строятся новые белки, нужные для развития молодого организма. Содержание белка в сельскохозяйственной продукции определяет ее кормовое значение. Например, вегетативная масса бобовых, которая является ценным кормом для скота, содержит в 3-5 раз больше азота, чем солома злаков. Ученые всего мира трудятся над проблемой селекции зерновых культур, пытаясь повысить содержание лизина в белках. Особенно остро эта проблема существует в отношении кукурузы, семена которой содержат белков меньше, чем семена других зерновых; а также в белках кукурузы содержится мало лизина и триптофана [30,77].

Азотистые вещества в здоровом зерне представлены главным образом белками (5-26%). Часть белков играет структурную роль, а другая – ферменты. В зерне обнаружены следующие белки: альбумины, глобулины, проламины, глютелин. К представителям альбуминов в пшенице является лейкозин, глобулинов в ячмене – эдестин, в пшенице – глютелин; проламинов – глиадин пшеницы, гордеин ячменя, авенин овса [30,87].

Существенную роль белки выполняют в защите растений от инфекции. Устойчивые и неустойчивые к инфекции виды растений могут иметь различный не только состав, но и структуру белков. Например, в клетках картофеля, устойчивого к раку, находятся белки с очень плотной, жесткой глобулой. Наиболее активную деятельность против инфекции проявляют антиферменты, которые способны ингибировать ферменты паразита: из семян злаков получены ингибиторы  $\alpha$ -амилаз грибов; ферменты глюконазы, хитиназы вызывают мацерацию мицелия многих грибов-паразитов [77,76,104].

Белки осуществляют свойственные им функции только при оптимальных для них условиях (температура, pH, концентрация солей и т. п.). При влиянии различных физических (температура выше 60°C, высушивание, ультразвук, ультрафиолетовое облучение и др.) и химических (крепкие кислоты и щелочи, мочевины, соли тяжелых металлов, дубильные вещества и др.) факторов белки достаточно легко изменяют нативную структуру макромолекул, утрачивая ряд своих первоначальных свойств, таких, как растворимость и биологическая активность. Этому явлению присвоено название денатурация. Процесс денатурации происходит с нарушением четвертичной, третичной и частично вторичной структур белковой молекулы и не касается первичной структуры [46,84,104,105].

Таблица 2. Содержание аминокислот в растительном сырье, мг/ 100 г продукта [83]

Показатели	Морковь красная	Свекла	Горох	Виноград	Арбуз
Вода, %	88,0	86,0	14,0	80,2	89,0

Белок, %	1,3	1,5	20,5	0,8	0,7
Коэффициент пересчета	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25
Незаменимые аминокислоты	312	410	7615	121	169
Валин	43	53	1010	17	10
Изолейцин	35	60	1090	5	20
Лейцин	44	67	1650	12	18
Лизин	38	92	1550	13	64
Метионин	9	20	205	10	6
Треонин	32	53	840	50	28
Триптофан	8	13	260	2	7
Фенилаланин	31	45	1010	12	16
Заменимые аминокислоты	595	942	11773	477	583
Аланин	48	40	910	25	34
Аргинин	41	73	1616	80	18
Аспарагиновая кислота	135	328	2227	72	342
Гистидин	14	14	460	10	8
Глицин	29	38	950	5	29
Глутаминовая кислота	235	274	3173	90	95
Пролин	30	47	660	100	20
Серин	33	63	837	70	23
Тирозин	18	50	690	10	12
Цистин	12	15	250	15	2
Общее количество аминокислот	907	1345	19388	598	752
Лимитирующая аминокислота, скор, %	Мет.+ цис.-46, лей.-48	Лей.-64, мет.+ цис.-67	Мет.+ци с.-64	Илей.-21, лей.-29	Мет.+ цис.-33, лей.-37

Во многих растительных белках содержится недостаточное количество одной или даже двух-трех незаменимых аминокислот (табл.2). Например, в белке картофеля и большинстве бобовых (горох, фасоль) не хватает метионина и цистина (около 60% оптимального количества), в белке пшеницы содержится примерно 50% лизина по сравнению с составом идеального белка. Важно также учитывать, что растительные белки усваиваются организмом хуже по сравнению с животными: белки яиц и молока – на 96%, белки рыбы и мяса – на

95%, белки овощей – на 80%, белки картофеля, хлеба из обойной муки, бобовых – на 70%. Плохая усвояемость растительных белков обусловлена содержанием в растительных продуктах клетчатки, которая снижает усвояемость других компонентов пищи (жиров, углеводов, витаминов и минеральных веществ) [83].

### 1.2.3. Липиды

Растения являются одним из важнейших источников пищевых и технических липидов. Запасные липиды располагаются в семенах, ядрах и мякоти плодов многих растений [13,44,46,47]. Однако липиды растений до сих пор не полностью изучены [13]. К группе липидов относятся: воски, собственно жиры, стероиды, амфипатические липиды и липофильные пигменты. Общим свойством всех липидов является высокая гидрофобность. Липиды растворимы в эфире, бензине, бензоле. Это связано с наличием в их молекулах большого количества неполярных углеводородных радикалов [93].

*Собственно жиры* представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших карбоновых кислот. Высокомолекулярные жирные кислоты являются длинными углеводородными цепочками с насыщенными или ненасыщенными связями. От степени насыщенности жирных кислот зависит консистенция жира: чем выше степень насыщенности, тем более твердым при нормальных условиях будет жир.

В растительных жирах чаще других встречаются такие ненасыщенные кислоты, как линолевая ( $C_{17}H_{31}COOH$ ), олеиновая ( $C_{17}H_{33}COOH$ ), линоленовая ( $C_{17}H_{29}COOH$ ), из насыщенных – пальмитиновая ( $C_{15}H_{33}COOH$ ) и стеариновая ( $C_{17}H_{35}COOH$ ). Собственно жиры имеют очень высокую калорийность: 1 г жира дает 38,9 кДж (больше, чем углеводы и белки – 16,1 кДж) [84]. Из-за этого основной функцией жиров является запасная. Самое высокое содержание жиров в семенах масличных культур (% СВ): кунжут (52-65), клещевина (35-59), арахис (ядро 54-61и семена 24-30), арбузы (семена 12-45), рапс озимый (45-49), лен масличный (30-49), горчица сизая (35-47), рыжик

(25-46), миндаль (ядро 40-44), подсолнечник (семянка 33-57), сафлор (25-37), соя (14-25), пшеница (зародыш 7-8), чай (семена 18-20) [102,58].

Так как семена масличных культур насыщены жирами, они являются ценным сырьем для производства масел, предназначенных для пищевых и промышленных целей [103].

*Стероиды* представляют собой конденсированные структуры из четырех углеводородных циклов, которые в свою очередь являются высокомолекулярными спиртами или их сложными эфирами. Такие гидрофобные вещества выполняют определенную роль в структуре клеточных мембран, стероидную природу имеют витамины группы D (эргостерол). Наибольшее количество стероидов содержат дрожжи и плесневые грибы [46,47,104].

*Воски* являются наиболее гидрофобными веществами из всех липидов, представляют собой сложные эфиры одноатомных высокомолекулярных спиртов и высших жирных кислот с числом углеродных атомов от 24 до 36. В растительных восках зачастую встречается цетиловый спирт ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{OH}$ ). Кроме эфиров воски могут содержать также молекулы свободных высокомолекулярных спиртов, кислот и углеводов [46,60,94].

Листья, стебли, стволы и плоды растений имеют тонкий восковой слой, который защищает их от смачивания водой и проникновения микроорганизмов [46,93,105]. Растительные воски образуются в цитоплазме, накапливаются в виде отдельных пластинок в клеточной оболочке эпидермальных клеток и выступают на ее поверхности в форме гранул, палочек, ячеек. Созданная таким образом кутикула предохраняет листья, стебли и плоды растений от высыхания при дефиците влаги. Восковой налет выполняет роль преграды для попадания в растение патогенных микроорганизмов, а также некоторых вредных насекомых. Воски используются при изготовлении свечей, кондитерских изделий, косметических средств, жевательной резинки, полировальных составов, в фармацевтике и т.д. [46].

*К Липофильным пигментам* относятся растворимые в органических растворителях пигменты, такие как каротиноиды и хлорофиллы. Хлорофиллы – это зеленые пигменты растений. Молекула хлорофилла за счет структурных изменений и физико-химических особенностей может осуществлять три важнейшие функции: избирательно поглощать энергию света, преобразовывать ее в энергию электронного возбуждения (или запасать ее в виде энергии электронного возбуждения); фотохимически трансформировать энергию возбужденного состояния в химическую энергию [46,60].

*Амфипатические липиды* наиболее часто в растениях представлены гликолипидами, сульфолипидами и фосфолипидами. В живой клетке амфипатические липиды являются основой всех биологических мембран [93].

#### **1.2.4. Нуклеиновые кислоты**

Нуклеиновые кислоты представляют собой макромолекулы кислотного характера. Они содержатся в ядре клетки, а также в цитоплазме. При их ферментативном гидролизе получают нуклеотиды, в состав которых входят: азотистые основания – производные пиримидина или пурина; углеводы – пентоза (рибоза или дезоксирибоза); а также один, два, или три остатка фосфорной кислоты [46,47].

Нуклеиновых кислот в растениях содержится не более 10% от количества белка. В клетках встречаются два типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновая кислота (РНК) и дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) [30].

Химические отличия ДНК и РНК заключаются в следующем. ДНК содержит пентозу – дезоксирибозу, а РНК – рибозу. В состав обеих нуклеиновых кислот входят одни и те же пурины – аденин и гуанин, а также пиримидин цитозин. Но, кроме того, ДНК содержит пиримидин тимин, а РНК – урацил.

В составе ДНК высших растений выявлены 5-метилцитозин и 5-оксиметилцитозин. Эти пиримидины присутствуют в небольшом количестве и называются минорными (редкими) компонентами. В настоящее время исследуется нуклеотидный состав ДНК различных растений. При постоянстве

отношения гуанин-цитозин и тимин-аденин соотношение между этими парами оснований у ДНК разных видов может быть различно[30].

Таблица 3. Нуклеотидный состав ДНК растений (в % к сумме оснований)

Название	Гуанин (Г)	Цитозин (Ц)	5-метил- цитозин	Аденин (А)	Тимин (Т)	(А+Т): (Г+Ц)
Дрожжи	18,3	17,4	-	31,7	32,6	1,80
Аспергилл	25,1	26,0	-	25,0	24,9	1,00
<i>Rhabdonema adriaticum</i>	18,6	31,4	-	18,3	31,7	1,71
<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	27,3	26,2	-	23,1	23,4	0,87
<i>Cystosira bartaba</i>	29,5	29,3	-	20,8	20,4	0,70
Пшеница (семена)	22,7	16,8	6,0	27,3	27,1	1,19
Горох (корень)	21,0	14,0	5,0	32,0	28,0	1,50
Морковь (листья)	23,2	17,3	6,0	26,7	26,8	1,15
Кукуруза (зародыш)	22,8	17,0	6,2	26,8	27,2	1,16

Таблица 4. Нуклеотидный состав РНК растений (в % к общему количеству нуклеотидов)

Название	Гуанин (Г)	Цитозин (Ц)	Аденин (А)	Урацин (У)
Дрожжи	24,6	25,4	22,6	27,4
Аспергилл	31,1	24,7	25,1	19,1
<i>Rhabdonema adriaticum</i>	28,6	24,0	26,2	21,2
Горох (корень)	28,0	25,0	23,0	24,0

Табак (лист)	26,1	23,5	24,7	25,0
Кукуруза (листья)	27,9	22,8	26,0	24,4

Содержание нуклеиновых кислот в растениях не очень высоко и с возрастом уменьшается [30].

### 1.2.5. Олигоэлементы растительной биомассы

Растения могут поглощать из окружающей среды почти все элементы периодической таблицы Д. И. Менделеева (табл.5). Углерод (С), кислород (О), водород (Н) и азот (N) составляют 95 % сухой массы растительных тканей, такие элементы называются органогенами, а оставшиеся 5 % приходится на зольные вещества. К зольным веществам относятся входящие в растение минеральные элементы, для определения содержания которых органического вещества растений подвергают сжиганию. Содержание золы зависит от условий выращивания растений, а также их вида. Среднее содержание золы в семенах – 3%, в листьях 5-15%, в корнях и стеблях 4-5%. Наименьшее количество золы содержится в мертвых клетках древесины (примерно 1%). Обычно, чем богаче почва и чем суше климат, тем больше в растениях зольных элементов [104,105].

Содержание зольных элементов в древесине – 1-2% от массы. В сельскохозяйственных отходах – 1,5-4%. В состав зольных элементов растительных материалов входит около 18 элементов. Главные из них – Са, Mg, К, Na и Р. Зола содержит 10-25% карбоната калия ( $K_2CO_3$ ) и соды ( $Na_2CO_3$ ), а остальная часть состоит из солей кальция и магния угольной, фосфорной и кремниевой кислот. Зола состоит из растворимой (10-20%) и нерастворимой в воде частей [87].

Таблица 5. Содержание химических элементов в растениях [104,105]

Химический элемент	Массовая доля в пересчете на сухое вещество		
	мкмоль/г	мг %	%
Марганец (Mn)	1,0	5	-
Железо (Fe)	2,0	10	-
Сера (S)	30	-	0,1
Кальций (Ca)	125	-	0,5
Магний (Mg)	80	-	0,2

Фосфор (P)	60	-	0,2
Калий (K)	250	-	1,0
Азот (N)	1000	-	1,5
Кислород (O)	30000	-	45
Углерод (C)	35000	-	45
Водород (H)	60000	-	6

**Микроэлементы** входят в группу незаменимых питательных элементов, количество которых в растительных тканях измеряется тысячными и сотысячными долями процента [77]. В жизни растений микроэлементы участвуют в образовании органических веществ.

*Марганец* (Mn) поступает в растение в виде ионов  $Mn^{3+}$ , активизирует ферменты, которые катализируют реакции цикла Кребса. Содержание этого микроэлемента у различных растений сильно колеблется [77].

*Бор* (B) поступает в растение в составе аниона борной кислоты. Он является одним из наиболее важных микроэлементов, в особенности для двудольных растений [60].

К **макроэлементам** относятся химические элементы, которых в живых организмах содержится больше 0,001 %.

*Азот* (N) составляет около 1,5 % сухой массы растений. Он входит в состав белков, нуклеиновых кислот, липидных компонентов мембран, фотосинтетических пигментов, витаминов и других жизненно важных соединений [104].

*Фосфор* (P) содержится в количестве 0,2-1,2 % сухой массы растения [77].

*Сера* (S) содержится в растительных тканях в количестве 0,2-1,0 % от сухой массы.

*Калий* (K) содержится в растениях в количестве около 1 % (в расчете на сухую массу). В растительных тканях его гораздо больше, чем других катионов.

*Кальций* (Ca) входит в состав растений в количестве 0,2 % СВ. Поступает в растение в виде иона  $Ca^{2+}$ , накапливается в старых органах и тканях. Кальцием занята большая часть катионообменной поверхности корня.

*Магний* (Mg) содержится в растительных тканях в количестве 0,2 – 3,1% сухой массы. Около 10-12 % магния входит в состав хлорофилла [77].

*Железо* (Fe) входит в состав растений в количестве 0,08 % от сухой массы. Поступает в растение в виде  $Fe^{3+}$ . Растения способны включать железо в запасные вещества. Так, белок ферритин содержит железо в негеминовой форме [60].

### **1.3. Взаимосвязь микроорганизмов и растений**

Симбиозы растений с микроорганизмами известны уже несколько столетий и широко использовались людьми в практической деятельности еще задолго до выяснения природы этого явления. Эволюция создала существующий мир макроорганизмов не как индивидуальные организмы, а как симбиозы с окружающим микромиром [100,82]. Открытие новых групп растительных симбиозов и расширение числа видов среди таксонов растений, участвующих в образовании ранее известных, позволяет предположить, что явление симбиозов не исключение, а скорее правило, закономерность в природе, и симбиотические ассоциации представляют собой одну из основных форм существования жизни [52,72,121,71].

Изучение межорганизменных отношений в настоящее время приобрело всеобъемлющий характер и оказывает все более заметное воздействие на развитие практически всех областей биологии. Доказано, что индуцируя крупные изменения, симбиоз определяет становление новых форм жизни, которые не могли бы возникнуть при эволюции свободноживущих организмов [52,121]. В современной литературе понятие «симбиоз» употребляется чаще всего как синоним термина «мутуализм», что подразумевает длительный пространственный контакт симбиотических морфологических структур, резервуаров, клубеньков, полостей, в которых происходит размножение, накопление микросимбионтов, и где они выполняют свою основную метаболическую функцию [82,121]. Мутуализм определяется как форма

взаимовыгодного симбиоза организмов, при котором существование обоих или одного из партнеров невозможно без сожителя.

В последнее десятилетие меняется научное понимание природы симбиоза. На смену представлениям о симбиозах как о двухкомпонентных системах в результате уточнения наших знаний об этом феномене приходит понимание симбиозов как многокомпонентных систем, в которых, помимо доминантного микросимбионта, существует несколько ассоциативных микросимбионтов. Ассоциативные микросимбионты, часто присутствующие на всех стадиях развития макросимбионта, играют значительную роль в формировании, стабильном существовании и продуктивности симбиоза в целом. В связи с этим изменяется взгляд на давно известные и ставшие уже классическими симбиозы растений с бактериями сем. *Rhizobiales*, актиномицетами рода *Frankia* и микоризными [32]. В настоящее время среди ассоциативных микросимбионтов выделена группа эндофитных бактерий и грибов (дрожжей), способных колонизировать внутренние ткани различных органов растений [41,118]. Эти микросимбионты оказывают более выраженное позитивное влияние на рост растения- хозяина за счет компартментации внутри тканей растений.

### **1.3.1. Растительно-микробные взаимодействия**

Растительно-микробные взаимодействия играют важную роль в поддержании жизни на планете. Среди таких взаимодействий важно отметить надземные и внутрпочвенные.

Микроорганизмы на планете появились раньше, чем растения. Они в жизни растений играют роль средообразования и общего питания. Микроорганизмы продуцируют стимуляторы роста и другие полезные для растений вещества. Микроорганизмы фактически создают почву для растений, а растения в свою очередь выполняют физическую защиту микроорганизмов, а также принимают участие в их распространении [61].

## **Роль микроорганизмов в жизни растений**

Микроорганизмы осуществляют разложение и минерализацию растительных остатков и органического вещества в целом, высвобождая и возвращая в почву минеральные элементы, необходимые для роста растений, а в атмосферу – CO<sub>2</sub> и некоторые другие газы. Микроорганизмы фактически создают почву, они продуцируют стимуляторы роста растений, токсические и другие вещества.

Бактерии играют важную роль в обеспечении экосистем азотом. Активными и наиболее изученными азотфиксаторами являются симбиотические азотфиксирующие бактерии, особенно представители рода *Azospirillum*, *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*. В обеспечении растений фосфором существенную роль играют грибы. Корни растений обрастают грибами с образованием микоризы. Ризосферные микроорганизмы также оказывают и прямое защитное действие одних растений относительно других.

Существуют микроорганизмы-стимуляторы роста. Например, некоторые штаммы бактерий рода *Pseudomonas*. Они защищают растения от заморозков, предотвращая кристаллообразование на наземных частях растения при кратковременном резком понижении температуры. Также существуют микроорганизмы, которые оказывают негативное воздействие на растения. Кроме того, что имеет место прямой паразитизм на растениях, такие микроорганизмы создают анаэробный биоз в переувлажненных почвах. В богатых органическим веществом почвах иногда возникает массовое развитие сульфатредуцирующих бактерий, выделяющих сероводород, крайне ядовитый для всего живого [63].

### **1.3.2. Растения как центр формирования симбиотических сообществ микроорганизмов**

Растения представляют собой центр развития специализированных бактериальных сообществ, определяет их классификацию и пространственную

и функциональную организацию. Известно, что во всех этапах развития растений, начиная от прорастания семян и заканчивая разложением остатков, в той или иной степени принимают участие микроорганизмы. В современной науке органы растений рассматриваются как совокупность специализированных экологических ниш микроорганизмов: филлосфера (среда, окружающая листья и стебли растений), ризосфера и ризоплана (часть почвы, расположенная вокруг корня), спермосфера (семена и плоды). В процессе освоения микроорганизмами экониш, связанных с жизнедеятельностью растений, заселялась не только их поверхность, но и внутреннее пространство – межклеточные полости и ткани [32].

На поверхности органов растений постоянно присутствуют те или иные группы микроорганизмов. При формировании микрофлоры на растениях, в том числе и на их корнях, важную роль играют продукты растительного происхождения, которые поступают в окружающую среду в процессе роста растений и представляют собой различные органические соединения, которые характеризуют филло- и ризосферу определенных растений. Микроорганизмы могут стимулировать выделение растением корневых экзометаболитов.

Вдоль растущего корня плотность микроорганизмов неодинакова, т.е. зоны с наибольшей плотностью микроорганизмов чередуются с зонами низкой плотности. Пики разной плотности микроорганизмов смещаются во времени вдоль корня, таким образом образуются микроколонии, некоторые из которых состоят из практически чистых монокультур микроорганизмов, в то время, как другие сформированы сложными сообществами [41,32].

Из многих литературных источников известно, что микробные сообщества полифункциональны, то есть существуют в виде коопераций. В ризосфере корней наиболее часто встречаются синтрофные взаимоотношения, то есть один организм готовит субстрат для другого[32].

### **1.3.3. Влияние регуляторов роста растения на качество получаемой продукции**

Регуляторы роста растений положительно влияют на увеличение урожайности сельскохозяйственных культур и на качество сельскохозяйственной продукции. При обработке растений препаратами-регуляторами роста увеличивается содержание белка и клейковины в зерне, улучшаются мукомольно-хлебопекарные свойства [31]. Увеличивается выход сухих веществ, масла из семян, возрастает содержание сахара, витамина С, каротина, крахмала, снижается содержание нитратов [69,106,107,99,89,12,90,88,53,37].

Обработка растений различными биологическими препаратами повышает устойчивость растений к вирусным болезням, усиливает функции иммунитета растений. При экзогенной обработке растений продуктами метаболизма некоторых микроорганизмов активируются защитные механизмы против многих патогенов [4].

### **1.3.4. Заключение**

Представленный в обзоре литературы материал демонстрирует перспективность получения растительно-микробного продукта, позволяющего решать важнейшие проблемы в современных биотехнологических производствах, то есть получать микробные нутриенты – регуляторы роста природного происхождения, влияющие на важнейшие процессы развития растений, тем самым повышая их устойчивость к неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Уже имеющиеся подобные продукты не смогли в полной мере решить проблемы, стоящие перед биотехнологами. Приблизиться к обширному решению этих важнейших проблем мы и попытались в настоящей работе.

## 2. Экспериментальная часть

Исследования проводились на кафедрах «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» МГУПП; «Микробиология и иммунология», «Физиологии растений» и в лаборатории «Искусственного климата» МСХА им. К.А. Тимирязева; а также в лаборатории «Федерального центра оценки безопасности и качества зерна и продуктов его переработки» Россельхознадзора России.

### 2.1. Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись различные штаммы дрожжей, выделенные нами из растительного сырья, натурального молока животных и человека.

Также в работе были использованы почвенные бактерии рода *Azotobacter* (*azotobacter chroococcum Sp*), выделенные из дерново-подзолистой почвы из коллекции кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» МГУПП.

*Azotobacter chroococcum* является азотофиксирующей бактерией, которая была выделена первично из почвы голландским микробиологом М.В. Бейерником. Он развивается в широком доступе кислорода, имеет характерную форму клетки в виде удлиненного кокка. Клетки азотобактера довольно крупные (от 1 до 10 микрометров). В почвах, имеющих кислую среду, он не встречается, оптимальный pH для его развития 7,0 или 7,2, максимум – около 9,0. Представители рода *Azotobacter* – мезофильные микроорганизмы, т.е. растут при температуре 20-30°C [26].

При выполнении всех лабораторных методов анализа была использована лабораторная посуда, изготовленная согласно нормам и правилам: ГОСТ 29044-91 (ИСО 384-78) «Лабораторная посуда стеклянная», ГОСТ 1770-74 (ИСО 1042-83, ИСО 4788-80) «Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия», ГОСТ Р

ИСО 1769-94 «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки. Цветное кодирование», ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81) «Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования»; ГОСТ 9147-80 «Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия».

### **2.1.1. Сырье, применявшееся в работе**

Для создания питательной среды мы использовали углеводное и целлюлозосодержащее сырье пищевого и кормового достоинства: овощи, фрукты, корнеплоды, продукты переработки зерна, солому и сено, листья садовых и дикорастущих деревьев и кустарников.

Для исследования использовалось сухое целлюлозосодержащее сырье:  
листья манго (из Республики Конго)

листья яблони (дикорастущей)

листья березы, листья маниока (из Республики Конго)

кукурузный стебель

свекольные листья

листья груши (дикорастущей)

листья черной смородины

листья лебеды

листья клена

листья липы

рисовая солома (из Вьетнама)

сено луговое.

В качестве углеводистого субстрата использовались:

Яблоко ГОСТ Р 54697-2011 «Яблоки свежие, реализуемые в розничной торговой сети»

Столовая морковь ГОСТ 32284-2013 «Морковь столовая свежая, реализуемая в розничной торговой сети»

Столовая свекла ГОСТ 32285-2013 «Свекла столовая свежая, реализуемая в розничной торговой сети»

Сахарная свекла ГОСТ Р 52647-2006 «Свекла сахарная. Технические условия»

Кожура банана ГОСТ Р 51603-2000 «Бананы свежие. Технические условия»

Сахарный тростник (из Республики Конго)

Манго (из Республики Конго)

Выжимка из винограда ГОСТ 32786-2014 «Виноград столовый свежий. Технические условия»

Также использовались гороховая мука, кукурузная мука, мука маниока, дробленый и пророщенный ячмень, как крахмалистые субстраты.

Овсяные отруби ТУ 9295-004-37365860-2013 (пищевая ценность представлена в таблицах 6 и 7)

Таблица 6. Пищевая ценность овсяных отрубей (среднее значение) на 100 г

Белки	13,5 г
Жиры	4,8 г
Углеводы	25,0 г
Пищевые волокна	36,0 г
Энергетическая ценность	197 ккал/826 кДж

Таблица 7. Содержание витаминов и минеральных веществ на 100г

Железо	8,54мг
Магний	104,6мг
Фосфор	810,0мг
В1	0,76мг
В2	0,12мг
Е	1,3мг

### **2.1.2. Реактивы, использованные в работе**

Реактив Несслера; аммиак водный, 25%; реактив Барнштейна; реактив Фелинга; 4%-ный раствор сульфата меди; щелочной раствор сегнетовой соли; кислый раствор железоммонийных квасцов; раствор перманганата калия; серная кислота концентрированная; пероксид водорода 30%-ный; едкий натрий 0,5 Н раствор; спиртовой раствор фенолфталеина; реактив Несслера; стандартный раствор серноокислого аммония; ацетатный буферный раствор; основной и рабочий растворы йода; реактив Шомодьи; реактив Нельсона; универсальный буферный раствор.

### **2.1.3. Методы исследования**

#### **2.1.3.1. Методы приготовления питательных сред**

Для выделения из натурального молока и растительных субстратов содержащихся в них дрожжей готовят одну из возможных агаровых сред: Сабуро, морковный агар, отрубевый агар. Изготовленные среды разливают по колбам и косякам, стерилизуют в автоклаве 120°C 20 минут.

#### **2.1.3.2. Приготовление питательной среды Сабуро (ТУ 9398-002-78095326-2006)**

72,6 г порошкообразной среды размешивают в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды, добавляют 10 г агара, кипятят до полного расплавления агара 2-3 мин, фильтруют через ватно-маревый фильтр и снова доводят до кипения. Состав среды Сабуро г/дм<sup>3</sup>: панкреатический гидролизат рыбной муки 10,0;

панкреатический гидролизат казеина 10,0; дрожжевой экстракт 2,0; натрия фосфат однозамещенный 2,0; Д-глюкоза 40,0; агар 10,0±3,0; pH=6,0±0,3.

### **2.1.3.3. Приготовление питательной среды на основе корнеплодов моркови (морковный агар)**

Морковь измельчают на бытовой терке. Затем субстрат смешивают с водой в соотношении 1:2, смесь кипятят 10 мин. и процеживают через сито или ватно-марлевый фильтр для удаления твердой фазы. К полученному овощному экстракту добавляют агар-агар в количестве 2 % от общего объема. Размешивают до полного растворения агара. После растворения агара среду разливают по пробиркам и стерилизуют, затем пробирки складывают на скашиватель для увеличения площади газона.

### **2.1.3.4. Приготовление отрубевого агара**

10% водную суспензию пшеничных отрубей кипятят 10 мин. Затем фильтруют через сито или ватно-марлевый фильтр для удаления твердой фазы. Добавляют агар в количестве 2% от общего объема. Размешивают до полного растворения агара.

### **2.1.3.5. Приготовление питательной среды Эшби**

В небольшом количестве дистиллированной воды поочередно растворяют сахарозу или маннит – 20,0 г; калий фосфорнокислый однозамещенный ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – 0,2 г; сульфат магния ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) – 0,2 г; хлорид натрия ( $\text{NaCl}$ ) – 0,2 г, сульфат калия ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) – 0,1 г; карбонат кальция ( $\text{CaCO}_3$ ) – 5,0 г. Затем добавляют 1 мл раствора микроэлементов, после чего добавляют дистиллированную воду до отметки 1 дм<sup>3</sup>. Приготовленную питательную среду разливают в колбы с расчетным количеством микробиологического агара и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. (121°C) в течение 20 минут.

### **2.1.3.6. Метод приготовления раствора микроэлементов**

Состав раствора микроэлементов:

Компонент	Содержание, г/ дм <sup>3</sup>
-----------	--------------------------------

$H_3BO_3$	5	ГОСТ 18704 – 78
$(NH_4)_2MoO_4$	5	-
KI	0,5	ГОСТ 4232 - 74
NaBr	0,5	-
$ZnSO_4$	0,2	ГОСТ 4174 – 77
$Al_2(SO_4)_3$	0,3	ГОСТ 12966 – 85
$H_2O$	до 1 дм <sup>3</sup>	ГОСТ 6709 – 72

Соли в необходимых количествах поочередно растворяют в небольшом количестве воды и затем добавляют водопроводную воду до отметки 1 дм<sup>3</sup>. Раствор стерилизуют в лабораторном автоклаве при температуре  $(121 \pm 1)^\circ C$  в течение 40 мин.

#### **2.1.4. Методы культивирования микроорганизмов.**

ТФФ в лабораторных условиях проводят в чашках Петри при высоте слоя 1 – 1,5 см и влажности субстрата 50-55%. Чашки помещают в термостат на 24-72 часа. Выращивание осуществляют при оптимальной температуре воздуха  $30 \pm 2^\circ C$ .

При глубинной ферментации культивирование проводят в течение 24-48 ч в колбах вместимостью 750 см<sup>3</sup> на круговых лабораторных качалках при 180-220 об/мин и при температуре  $30 \pm 2^\circ C$ .

#### **2.1.5. Приготовление пророщенного ячменя**

Сухое зерно промывают от посторонних включений и замачивают в воде в течение определенного времени до влажности 42-45%, затем влажное зерно промывают под проточной водой, размещают в емкости для проращивания и ставят в термостат при температуре  $30-32^\circ C$  до длины ростков 2-3 см.

### **2.1.6. Приготовление питательной среды на базе целлюлозосодержащих компонентов для культивирования микроорганизмов при ТФФ**

Для получения питательной среды при твердофазной ферментации используют сухие растительные субстраты, измельченные стандартным способом до размера частиц 1,0-0,5 мм, добавляют их по 5 г в чашки Петри, стерилизуют текучим паром в автоклаве при 120°C в течение 40 минут.

### **2.1.7. Метод приготовления стерильных отрубей и рисовой соломы при ТФФ**

Для получения питательной среды используют овсяные отруби. В стеклянные чашки Петри добавляют отруби по 5 грамм, стерилизуют текучим паром в автоклаве при 120°C 40 минут. Таким же способом готовят и стерильную рисовую солому.

### **2.1.8. Приготовление питательной среды на базе комплексных целлюлозосодержащих субстратов и крахмалистых субстратов при ТФФ**

В чашки Петри добавляют сухой измельченный целлюлозосодержащий материал и крахмалистый субстрат (крахмалистым субстратом может быть: гороховая мука, кукурузная мука, мука маниока) в соотношение 1:1, далее хорошо перемешивают и стерилизуют текучим паром в автоклаве в течение 40 минут при температуре 120±1°C.

### **2.1.9. Приготовление питательной среды на базе комплексных целлюлозосодержащих субстратов и углеводистых субстратов при ТФФ**

В чашки Петри добавляют сухой измельченный целлюлозосодержащий материал и смешивают с полужидкими и влажными углеводистыми материалами до достижения влажности 50-60% (углеводистым субстратом может быть: жом, пульпа, выжимки), далее стерилизуют текучим паром в автоклаве в течение 40 минут при температуре 120±1°C.

### **2.1.10. Метод глубинного культивирования дрожжей на углеводистых субстратах**

В качалочные колбы объемом 750 см<sup>3</sup> наливают 100 см<sup>3</sup> воды и добавляют необходимое количество измельченного углеводистого субстрата (овощи и фрукты). Полученную гетерогенную смесь стерилизуют в автоклаве при 0,1МПа в течение 40 мин. Стерильной пипеткой отбирают 5-6 см<sup>3</sup> этих сред, этим материалом смывают культуру дрожжей с косяков агара и этот смыв возвращают в колбы. В засеянном материале подсчитывают в камере Горяева исходное количество дрожжевых клеток, а затем засеянные колбы инкубируют на качалке 24 часа при 30±2°С при 220-240 об/мин и снова подсчитывают количество клеток в проинкубированной культуре.

### **2.1.11. Приготовление питательной среды на базе двухкомпонентных субстратов**

К полученному измельченному целлюлозосодержащему сырью добавляют влажные компоненты углеводсодержащего сырья в определенном отношении. Хорошо перемешивают, стерилизуют текучим паром в автоклаве в течение 40 минут при температуре 120±1°С.

### **2.1.12. Метод обработки питательных сред перед засевом**

Стерилизацию жидких питательных сред, если не оговорено особо, проводят в паровом автоклаве при 1,0 атм в течение 40 мин. Твердофазные питательные среды стерилизуют 30-минутным прожариванием в сушильном шкафу при температуре 120-140°С.

### **2.1.13. Методы засева микроорганизмов**

При ТФФ посевной материал разводят в увлажняющем компоненте и засевают субстрат. Во всех случаях посевная доза составляет 200-300·10<sup>6</sup> дрожжевых клеток на 1 г.

#### **2.1.14. Поддержание чистых культур дрожжей и метод приготовления посевного материала**

Чистые культуры дрожжей хранят в пробирках со скошенным Сабуро-агаром, морковным агаром или отрубевым агаром в холодильнике при температуре 4°C. Смыв с них стерильной водопроводной водой фильтруют через бумажные фильтры (ГОСТ 12026-76 «Бумага фильтровальная лабораторная») и используют как посевной материал.

#### **2.1.15. Поддержание чистых культур бактерий и метод приготовления посевного материала**

Чистые культуры бактерий хранят в пробирках со скошенным Эшби-агаром в холодильнике при температуре 4°C. Смыв с них стерильной водопроводной водой фильтруют через бумажные фильтры (ГОСТ 12026-76 «Бумага фильтровальная лабораторная») и используют как посевной материал.

#### **2.1.16. Метод выделения и выращивания дрожжей на накопительных питательных средах**

При прямом посеве молока или растительных субстратов в измельченном виде на агаровые среды далеко не всегда можно обнаружить колонии дрожжей на этих средах. Поэтому весьма целесообразным в этом случае является использование накопительных питательных сред. Варианты накопительных сред могут быть различные.

Накопительной средой может быть само натуральное молоко или растительный субстрат, из которого выделяются искомые дрожжи. С целью накопления дрожжей может быть использован метод глубинного культивирования с аэрацией. Для этого готовят большие пробирки с ватными пробками, стерилизуют их в автоклаве, остужают, наливают в них по 5 см<sup>3</sup> исследуемого натурального молока или растворенного в стерильной водопроводной воде растительного субстрата, добавляют по 1 капле антибактериального антибиотика, например гентамицина (40 мг/см<sup>3</sup> в ампулах по 1 или 2 см<sup>3</sup>) инкубируют 24 часа на качалке (220-240 об/мин) при 30±2°C.

Количество дрожжевых клеток в культурах подсчитывают в камере Горяева или методом предельных разведений.

Вариантом накопительной среды являются стерильные и подсушенные зерновые отруби, которые насыпают в одноразовые пластиковые чашки Петри по 5 г или стерилизуют в стеклянных чашках Петри и подсушивают. В этом случае к 5 см<sup>3</sup> исследуемого натурального молока или растворенного растительного субстрата добавляют 1 каплю бактериального антибиотика и это молоко или растительный субстрат стерильным шпателем тщательно перемешивают с отрубями, а затем эти чашки инкубируют при 30±2 °С 24-48 часов. Количество дрожжевых клеток в культурах подсчитывают в камере Горяева.

#### **2.1.17. Метод получения чистых культур дрожжей**

После того, как получена накопительная, приступают к выделению чистой культуры. Чистая культура может быть получена из отдельной колонии или одной клетки. Основным методом выделения чистых культур микроорганизмов является метод, предложенный Р. Кохом. Агаровые среды для выделения дрожжей в колбах расплавляют, остужают до 50-55 °С, стерильно вносят антибактериальный антибиотик (например 40 мг гентамицина на 400 см<sup>3</sup> агаровой среды) (50 мкг/мл) и разливают по стерильным чашкам Петри. На застывшие пластинки агара засевают штрихом бактериологической петлей жидкую культуру дрожжей на натуральном молоке с антибиотиком, инкубированную на качалке и суспензию твердофазной отрубевой культуры в стерильной воде. Засеянные чашки инкубируют в термостате при 30±2°С 48-72 часа. Контролируют появление изолированных колоний дрожжей и при обнаружении таковых пересевают их на косяки одного из видов агара (среда Сабуро, морковный агар, отрубевый агар, сывороточный агар).

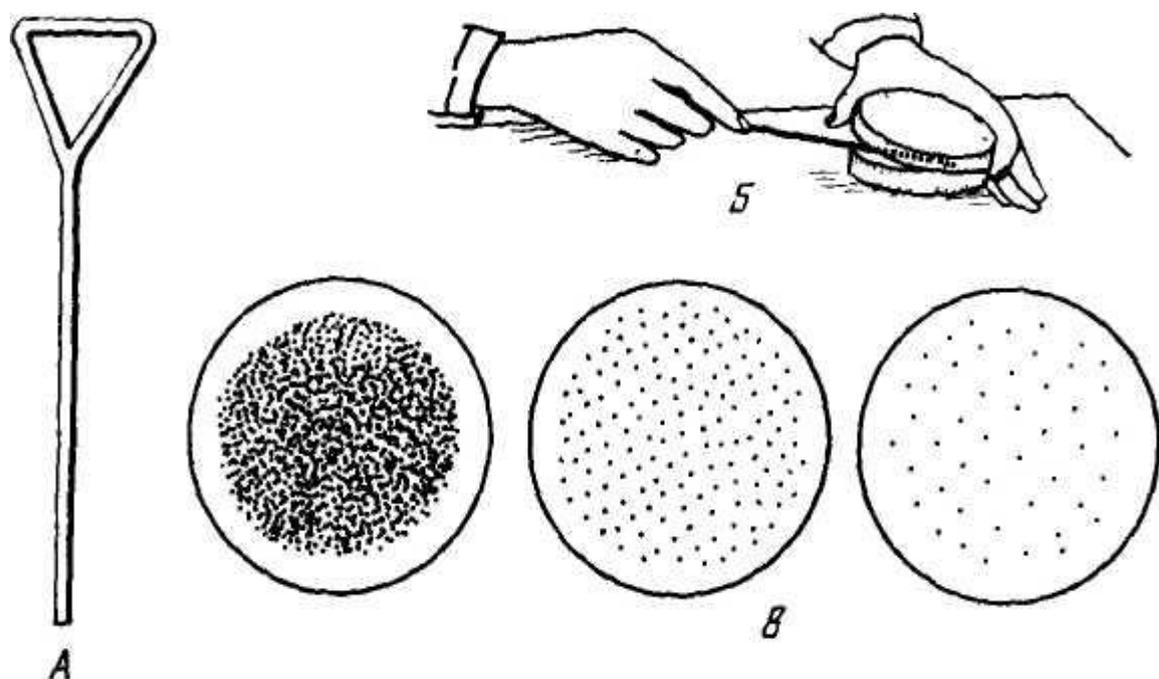


Рис 1- Рассев культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды шпателем:

А — шпатель Дригальского; Б — рассев; В — рост микроорганизмов после посева

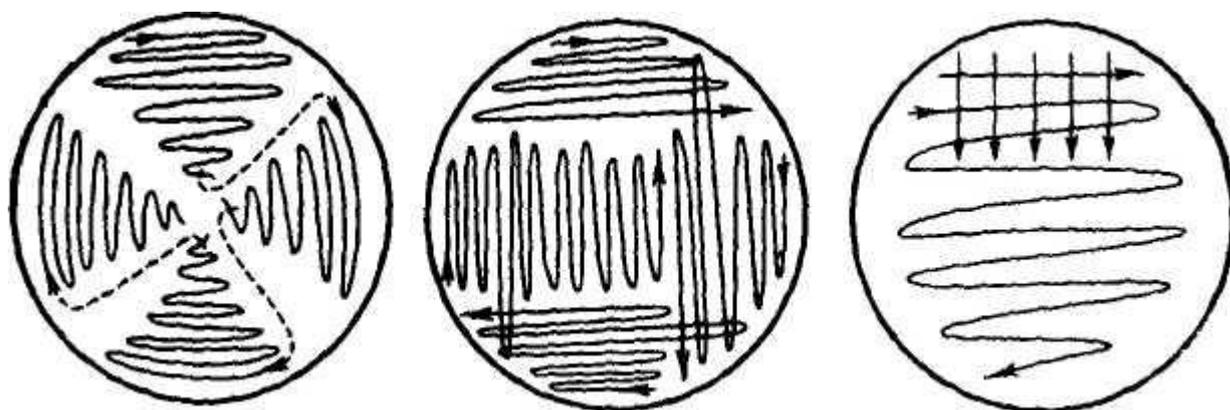


Рис. 2- Схема посева культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды петлей.

В некоторых случаях бывает достаточно одного посева в плотную среду, чтобы получить чистую культуру. Однако чаще посев в плотную питательную среду на поверхность скошенной плотной среды в пробирки или в жидкую

среду повторяют 2-3 раза. В качестве посевного материала при этом используют культуру, полученную из отдельных колоний.

#### **2.1.18. Метод отбора дрожжей-суперпродуцентов биомассы на твердофазных субстратах.**

Из культур разных дрожжей, выращенных твердофазно на различных растительных субстратах делают разведения и подсчитывают в них количество дрожжевых клеток, накопившихся на этих средах. Сведение всех данных в одну таблицу позволяет выявить культуры, обладающие максимальной продуктивностью на твердых субстратах, в том числе достаточно бедных по своему химическому составу и обычно для выращивания дрожжей не применяющихся.

#### **2.1.19. Метод конструирования дрожже-бактериальных ассоциаций для биоконверсии растительных субстратов**

В качалочные термостатные колбы объемом 750 см<sup>3</sup> помещают 50г свекольной пульпы со 100 см<sup>3</sup> водопроводной воды, стерилизуют на автоклаве при 0,1МПа в течение 40 мин. Стерильной пипеткой отбирают 5-6 см<sup>3</sup> этих сред, этим материалом смывают культуру дрожжей с косяков агара и бактерии с косяков среды Эшби; затем эти смывы возвращают в колбы с соблюдением правил асептики и инкубируют на качалке при 220 об/мин и температуре 30±2°С в течение 48ч для получения посевного материала глубинным путем.

В чашки Петри помещают по 5г измельченного кукурузного стебля и стерилизуют в автоклаве 40 минут при 120°С, затем стерильный кукурузный стебель увлажняют посевным материалом, имеющим дрожжевые и бактериальные клетки, до 50%-ной влажности и перемешивают до получения гомогенной среды с соблюдением правил асептики. В полученной среде подсчитывают исходное количество дрожжевых клеток, а общее количество бактерий в исследуемых образцах определяют методом предельных разведений путем посева проб из последовательных десятикратных разведений в два

параллельных ряда чашек Петри со стерильной средой Эшби, после чего их инкубируют 24 - 72 часов в термостате при  $30\pm 2^\circ\text{C}$  при ТФФ и снова подсчитывают количество клеток в проинкубированной культуре с соблюдением правил асептики.

Сравнение продуктивности для каждого штамма дрожжей с бактериями позволяет судить о способности бактерий ингибировать или нет рост дрожжей при твердофазной ферментации на данном субстрате.

#### **2.1.20. Метод приготовления получаемого продукта**

Полученные на основе биоконверсии растительного сырья гомогенизированные дрожже-бактериальные ассоциации инкубируют в термостате в течение 24-72 часов при температуре  $30\pm 2^\circ\text{C}$ , подсчитывают количество клеток в проинкубированной культуре.

#### **2.1.21. Метод количественного учета дрожжевых клеток в получаемом продукте**

Метод основан на подсчете количества клеток, как мертвых, так и живых, с помощью микроскопа в препарате анализируемой пробы. Подсчет проводили в счетной камере Горяева.

Счетная камера представляет собой толстое предметное стекло, в середине которого находится плоское углубление: расстояние от его дна до нижней поверхности покровного стекла, плотно притертого к краям углубления, известно и равно 0,1мм. Наличие в центре дна счетной камеры квадратной сетки общей площадью  $1\text{ мм}^2$ , состоящей из 400 элементарных квадратов ( $20\times 20$ ) позволяет осуществлять пересчет количества клеток, находящихся в пределах одного элементарного квадрата, на объем жидкости, в которой взвешены клетки, по формуле:

$$T = \frac{n}{\sum_{i=1}^n x_i / n} \times F \times 10^6 / 4,$$

где  $T$  – содержание клеток в  $\text{см}^3$ ,  $x_i$  – число клеток в элементарном квадрате со стороной  $1/20$  мм,  $n$  – общее число учтенных квадратов (измерений),  $F$  – фактор разбавления [16,40].

### **2.1.22. Метод определения содержания микроорганизмов, в том числе бактерий в получаемом продукте**

Общее количество бактерий в исследуемых образцах определяют методом предельных разведений путем посева проб из ряда последовательных десятикратных разведений с последующим определением наиболее вероятного числа микроорганизмов в пробе по так называемой числовой характеристике, отражающей количество пробирок, засеянных определенными разведениями пробы, свернувшимся после инкубирования в течение трех суток при температуре  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . Численность бактерий определяют по числу колоний, сформировавшихся на плотных агаровых средах Эшби.

### **2.1.23. Определение содержания азота по методу Несслера**

Содержание сырого протеина определяют методом Несслера, делая при этом допущение, что весь азот является белковым. В пробирку помещали  $2 \text{ см}^3$  пробы, приливали  $2 \text{ см}^3$  концентрированной серной кислоты и 5-6 капель 30%-ного пероксида водорода. Пробирку закрывали стеклянным затвором и помещали в печь для сжигания под тягой. Окончание окисления узнавали по полному обесцвечиванию жидкости в пробирке. Если окраска черного или желтого цвета, следует охладить пробирку, добавить 2-3 капли  $\text{H}_2\text{O}_2$  и вновь сжигать до полного обесцвечивания. Следует избегать бурного кипения при нагревании. По окончании окисления пробирку охлаждали и ее содержимое количественно переносили в мерную колбу объемом  $50 \text{ см}^3$ . Затвор ополаскивали дистиллированной водой и смыв также переносили в колбу, после чего доливали водой до метки. Из колбы отбирали  $1 \text{ см}^3$  и точно оттитровывали 1,0 н гидроксидом натрия или калия из микробюретки по фенолфталеину (1-2 капли) до слабо-розовой окраски для определения содержания серной кислоты. После этого из первой колбы отбирали  $10 \text{ см}^3$  и

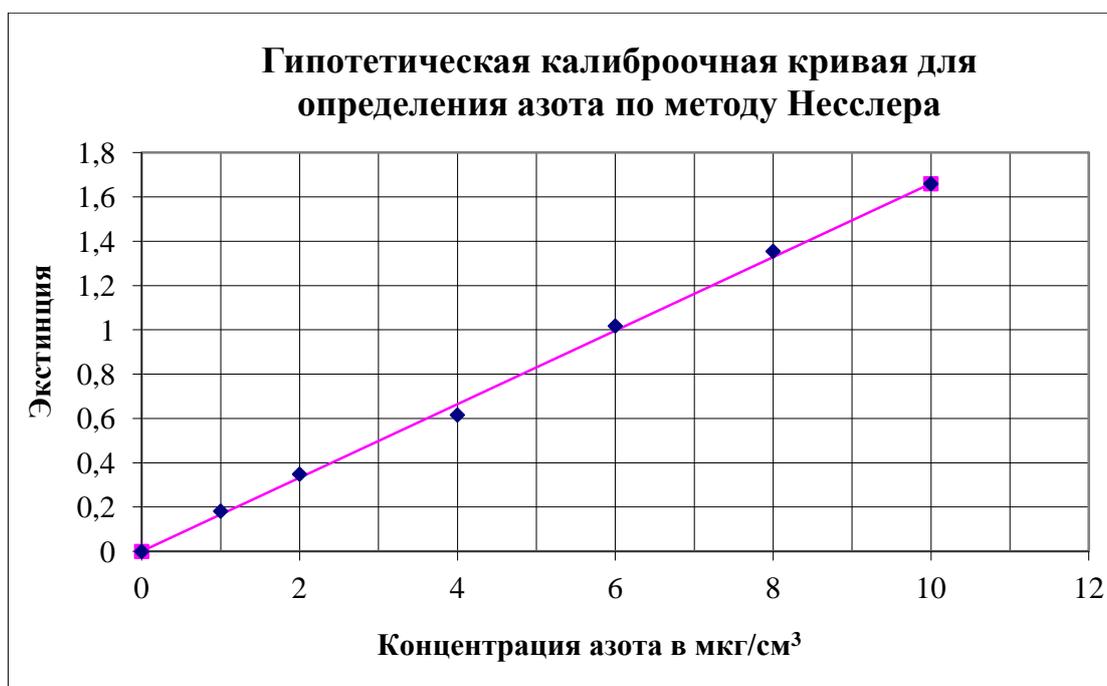
помещали в другую мерную колбу объемом 50 см<sup>3</sup>. Добавляли для нейтрализации рассчитанное количество 1,0 н гидроксида натрия или калия и доводили дистиллированной водой до метки.

Очень важно точно оттитровать и определить количество щелочи, необходимое для нейтрализации 10 см<sup>3</sup> опытного раствора, так как перещелачивание является причиной помутнения раствора, а недощелачивание вызывает выпадение солей ртути и опыт считается испорченным.

Из второй колбы брали в пробирки для колориметрирования три пробы объемом 5 см<sup>3</sup>, добавляли к ним по 0,5 см<sup>3</sup> реактива Несслера и сразу колориметрировали при длине волны 420 нм против контрольного раствора (5 см<sup>3</sup> воды с 0,5 см<sup>3</sup> реактива Несслера). По показанию фотоэлектроколориметра (ФЭК) и калибровочной кривой определяли концентрацию азота в пробирке в мкг/см<sup>3</sup>.

Для построения калибровочной кривой для метода Несслера пробы готовят из основного стандартного раствора серноокислого аммония или хлористого аммония, содержащего 20 мкг азота в 1 см<sup>3</sup>, готовят серию рабочих стандартных растворов объемом по 5 см<sup>3</sup> в пробирках с содержанием 2, 4, 8, 12, 16 и 20 мкг азота в 1 см<sup>3</sup>. В контрольную пробу наливают 5 см<sup>3</sup> воды. Затем во все пробирки добавляют по 0,5 см<sup>3</sup> реактива Несслера, содержимое пробирок хорошо перемешивают и сразу же растворы колориметрируют против контрольной пробы.

Полученные значения E вносят в таблицу и на основе этих данных строят калибровочную кривую. На оси абсцисс откладывают концентрации азота в мкг/см<sup>3</sup>, на оси ординат – экстинкцию. Полученные точки соединяют прямой, выходящей из точки пересечения осей.



**Рисунок 3 – Гипотетическая калибровочная кривая для определения азота по методу Несслера**

Для большей точности каждую точку делают в нескольких повторностях и получают несколько значений  $E$  ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ), используя параллели рабочих стандартных растворов (не менее трех).

Точные результаты получают путем умножения экстинкции на коэффициент пересчета ( $K$ ), который является коэффициентом пропорциональности между экстинкцией и концентрации вещества в растворе. Этот коэффициент равен котангенсу угла наклона калибровочной кривой к оси абсцисс [40].

#### **2.1.24. Метод определения аминокислотного состава белков**

Аминокислотный состав полученных продуктов определяли по ГОСТ32195-2013 «Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот»

#### **2.1.25. Метод определение влажности**

Определение влажности образцов проводят на приборе Чижовой. Сущность метода заключается в высушивании инфракрасными лучами навески исследуемого вещества, помещенного между двумя нагретыми

металлическими плитами. Для определения влажности предварительно заготавливают бумажный пакет и сушат в течение 3 минут при 165-170°C. Затем его охлаждают в эксикаторе в течение 5-6 минут и взвешивают на технических весах с точностью до 0,01 г. В заготовленный таким образом пакет отвешивают около 1 г образца. Навеску равномерно (встряхиванием) распределяют внутри пакета, затем с влажной навеской взвешивают, помещают в прибор и высушивают при 165-170°C в течение 6 минут. После высушивания пакет с навеской охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Влажность  $W$ (в %) рассчитывают по формуле:

$$W = \frac{(a - в)}{(a - б)} \times 100$$

Где  $a$  – масса сухого пакета с навеской до сушки, г;

$б$  – масса пустого высушенного пакета, г;

$в$  – масса пакета вместе с навеской после сушки, г.

#### **2.1.26. Метод определения рН растворов**

Величину рН питательных сред и культуральных жидкостей измеряют потенциометрическим методом с использованием рН-метра HANNA рН 211.

#### **2.1.27. Метод определения ферментативной активности дрожжей**

Экзоглюканазную и амилолитическую активность определяли фотоколориметрическим методом [70, 40].

#### **2.1.28. Метод определение гранулометрического состава**

Гранулометрический состав определяли по ГОСТ 12536-2014 «Грунты. Методы лабораторного определения гранулометрического (зернового) и микроагрегатного состава».

#### **2.1.29. Методы определение микроэлементов**

Определяли:

Калий по ГОСТ 26427-85 «Почвы. Метод определения натрия и калия в водной вытяжке»

Магний по ГОСТ 26428-85 «Почвы. Метод определения кальция и магния в водной вытяжке»

Железо по Методическим указаниям по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства М.ЦИНАО – 1992.

Массовую долю фосфора по ГОСТ 26657-97 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения содержания фосфора»

Массовая доля кальция по ГОСТ 26570-95 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения содержания кальция»

### **2.1.30. Методы определение других элементов**

Определяли:

Массовую долю сырой клетчатки по ГОСТ 31675-2012 «Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации»

Массовую долю сырого жира по ГОСТ 32905-2014 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения содержания сырого жира»

Массовую долю сырой золы по ГОСТ 28178-89 «Дрожжи кормовые. Методы испытаний»

### **2.1.31. Метод определения глюкозы и мальтозы**

Содержание глюкозы и мальтозы определяли по методу Бертрана по Методическим указаниям к выполнению лабораторных работ по биохимии издательства Московского Государственного Университета Пищевых Производств, Москва 1992 г.

### **2.1.32. Испытание полученного продукта**

Вегетационный опыт проводили в лаборатории искусственного климата. Полученный микробный нутриент вносили в сосуд объемом 1,5 дм<sup>3</sup>. Выращивали тест-растение. В помещении-фитотрон поддерживали температуру воздуха 20-26°C и относительную влажность 60-70%. Спектральный состав светового потока приближен к естественному. Тест-растение выращивали до определенной фазы вегетации. Продолжительность опыта – 21 сут. Повторность в опыте трехкратная. В контроле использовали искусственную почву, то есть субстрат на основе верхового торфа (1кг/сосуд), в опытном варианте смесь микробного нутриента (0,4 кг) и искусственной почвы субстрата на основе верхового торфа (0,6 кг) в соотношении 2:3.

Влияние микробного нутриента оценивали после проведения биометрических исследований (измерение длины стебля, подсчет количества листьев, количество всходов).

### **2.1.33. Повторность измерений и математическая обработка результатов**

В настоящей работе все эксперименты проведены в тройной повторности. Измерения физико-химических параметров исследуемых объектов проведены в двукратной, а микробиологических – минимум в четырехкратной повторностях. Прямой учет дрожжевых клеток в камере Горяева осуществлен с десятикратной повторностью.

Результаты измерений обработаны на персональном компьютере с помощью программного пакета Excel 2007, вычисляя среднее значение и стандартное отклонение для каждой величины, а также доверительный интервал при уровне значимости 95%.

## **2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **2.2.1. Селекция микроорганизмов-суперпродуцентов биомассы**

Растительная биомасса является основой пищевой цепи высших животных. Обогащение растительного сырья незаменимыми аминокислотами *in vivo* осуществляется за счет микробной (прежде всего бактериальной) микрофлоры, нарастающей в рубце дигастричных а также в слепой кишке и в толстом кишечнике всех высших организмов. Самым главным полимером растительной биомассы является целлюлоза, поэтому наиболее активными продуцентами полезной микробной биомассы на растительном сырье *in vitro* будут те микроорганизмы, которые способны интенсивно расти на целлюлозосодержащих субстратах, то есть способны активно расщеплять полимеры глюкозы. В последние годы в работах кафедры биотехнологии МГУПП достаточно четко определена способность дрожжей потреблять целлюлозосодержащие растительные материалы и накапливать на них микробную биомассу [58, 98, 48] при выращивании методом твердофазного культивирования на пшеничных отрубях. Эти штаммы были использованы нами в качестве стандарта продуктивности на твердых целлюлозосодержащих субстратах.

#### **2.2.1.1. Дрожжевая биоконверсия овсяных отрубей как метод селекции суперпродуцентов биомассы**

В качестве целлюлозосодержащего субстрата использованы овсяные отруби, благодаря своей доступности в торговой сети. В таблице 8 представлена продуктивность дрожжевых изолятов, выделенных нами самостоятельно и совместно с бакалаврами и магистрами МГУПП в ходе лабораторных работ по селекции дрожжей-продуцентов биомассы в 2015-2016 гг. Из таблицы видно, что в ходе проведенной работы выделить из женского грудного молока дрожжевой изолят более продуктивный по сравнению с контролем не удалось. Зато удалось выделить один весьма активный продуцент биомассы из коровьего молока. Он был идентифицирован как *Pichia*

*guilliermondii* 06.2016 на кафедре биологии почв МГУ и во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, где он и был депонирован.

Что касается поиска дрожжей-суперпродуцентов в собственной микрофлоре растительных субстратов, то этот вариант селекции оказался более успешным. Из разных растительных субстратов было выделено сразу 11 дрожжевых изолятов близких по продуктивности к контролю (таблица 9). Все они были идентифицированы на кафедре биологии почв МГУ как *Pichia guilliermondii*. *Pichia guilliermondii* представляет несомненный интерес для крупнотоннажной биоконверсии растительного сырья, и прежде всего сырья целлюлозосодержащего. Для сравнения мы подвергли биоконверсии разные источники сырья с помощью дрожжей *Pichia* разного происхождения: выделенных из женского грудного молока, из коровьего молока, из растительных биоценозов.

Таблица 8. Продуктивность молочных дрожжей при твердофазной ферментации

№ п/п	Название штамма (индекс)	Источник выделения	Продуктивность 10 <sup>9</sup> КОЕ/г (см <sup>3</sup> )		
			ТФФ на овсяных отрубях		
			24 ч	48 ч	72 ч
1	<i>Pichia sp.1</i>	Женское молоко	2,1	3,6	3,9
2	<i>Pichia sp.2</i>	Женское молоко	2,5	4,1	3,6
3	<i>Pichia sp.3</i>	Женское молоко	1,9	2,7	3,0
4	<i>Pichia sp.4</i>	Женское молоко	2,1	2,9	3,9
5	<i>Pichia sp.5</i>	Женское молоко	2,3	3,1	3,9
6	<i>Pichia sp.5</i>	Женское молоко	2,6	4,0	3,1
7	<i>Pichia sp.7</i>	Женское молоко	1,8	2,5	3,1
8	<i>Pichia sp.8</i>	Женское молоко	2,0	2,9	3,1
9	<i>Pichia sp.9</i>	Женское молоко	1,7	2,3	2,9
10	<i>Pichia sp.10</i>	Женское молоко	2,2	2,7	3,0
11	<i>Pichia sp.11</i>	Женское молоко	1,8	2,2	3,1
12	<i>Pichia sp.12</i>	Женское молоко	2,3	3,0	3,5
13	<i>Pichia sp.13</i>	Женское молоко	2,1	2,5	2,9
14	<i>Pichia sp.14</i>	Женское молоко	1,6	1,9	2,1
15	<i>Pichia sp.15</i>	Коровье молоко	2,2	2,7	3,0
16	<i>Pichia sp.16</i>	Коровье молоко	2,5	3,1	3,3

17	<i>Pichia sp.17</i>	Коровье молоко	2,0	2,4	2,5
18	<i>Pichia sp.18</i>	Коровье молоко	1,8	2,0	2,5
19	<i>Pichia sp.19</i>	Коровье молоко	1,3	1,7	2,1
20	<i>Pichia sp.20</i>	Женское молоко	1,1	1,5	1,9
21	<i>Pichia sp.21</i>	Женское молоко	1,7	2,3	2,8
22	<i>Pichia sp.22</i>	Женское молоко	2,3	2,6	3,2
23	<i>Pichia sp.23</i>	Коровье молоко	2,9	3,5	3,9
24	<i>Rhodotorula sp.</i>	Женское молоко	0,9	1,2	1,1
25	<i>Pichia guilliermondii Я1</i>	Коровье молоко	2,6	5,0	4,9
26	<i>Pichia anomala 9a</i>	Женское молоко	2,5	4,9	4,7

Таблица 9. Продуктивность дрожжей, выделенных из растительных материалов при твердофазной ферментации на овсяных отрубях

№ п/п	Название штамма	Источник выделения	Продуктивность дрожжей, 10 <sup>9</sup> КОЕ г		
			24 ч	48 ч	72 ч
1	<i>Pichia sp.1a</i>	Кукурузный стебель	2,0	2,8	3,1
2	<i>Pichia sp.2б</i>	Картофельные ростки	0,8	1,2	1,7
3	<i>Pichia sp.3в</i>	Кукурузный стебель	2,1	2,5	2,9
4	<i>Pichia sp.4г</i>	Кукурузный стебель	2,8	3,1	3,5
5	<i>Pichia sp.5д</i>	Кукурузный стебель	0,5	1,2	1,3
6	<i>Pichia guilliermondii П-8</i>	Семена подсолнечника	2,3	4,6	4,9
7	<i>Pichia guilliermondii П-9</i>	Соломенная мука	2,6	3,5	4,0
8	<i>Pichia guilliermondii П-10</i>	Кукурузный стебель	2,2	3,1	3,9
9	<i>Pichia guilliermondii П-12</i>	Кукурузный стебель	2,5	4,9	4,2

10	<i>Pichia guilliermondii</i> Ap	Сенная мука	2,2	4,7	4,6
11	<i>Trichospon sp.</i>	Листья Gnetum africanum	0,3	0,4	0,4

Исходя из результатов проведенных опытов, для дальнейших исследований нами было отобрано 4 штамма: *Pichia anomala* 9a, *Pichia guilliermondii* Ap, *Pichia guilliermondii* П-8, *Pichia guilliermondii* Я1.

### **2.2.1.2. Продуктивность отобранных штаммов дрожжей на измельченных твердых целлюлозосодержащих субстратах**

Главным компонентом всего растительного сырья являются труднорасщепляемые полимеры глюкозы. Способность микроорганизмов к биоконверсии натурального растительного сырья определяется прежде всего их способностью расщеплять целлюлозосодержащие материалы (природные и агропромышленные, первичные и вторичные). Среди них зерновые отруби по объему играют весьма скромную роль как субстрат для микробной биоконверсии. Значительно большую роль в пищевой цепи всего живого играют такие материалы как зерно и продукты его переработки, сено, сенная и травяная мука, жомы, шроты перерабатывающих предприятий, солома колосовых, стебли, листва технических культур и т.п. Некоторые из целлюлозосодержащих субстратов были испытаны в чистом виде в качестве твердофазных питательных сред при выращивании на них дрожжей *Pichia*, выделенных из женского грудного молока, из коровьего молока, из сенной муки и из семян подсолнечника.

Обсеменение целлюлозосодержащих субстратов проводилось смывами дрожжей стерильной водой с косячков сусло-агара. Таким посевным материалом целлюлозосодержащие субстраты доводили до 50%-ной влажности и содержания  $\approx 1 \cdot 10^8$  клеток/г увлажненного материала. Для нас особенный интерес представляла мука из вегетативной части растения кукурузы, а также

рисовая солома. Именно такое целлюлозосодержащее сырье в наибольших количествах накапливается в зерновом производстве Республики Конго и региона Центральной Африки.

В качестве целлюлозосодержащего субстрата использована соломенная, сенная, травяная мука и кукурузный стебель, которые наиболее широко распространены.

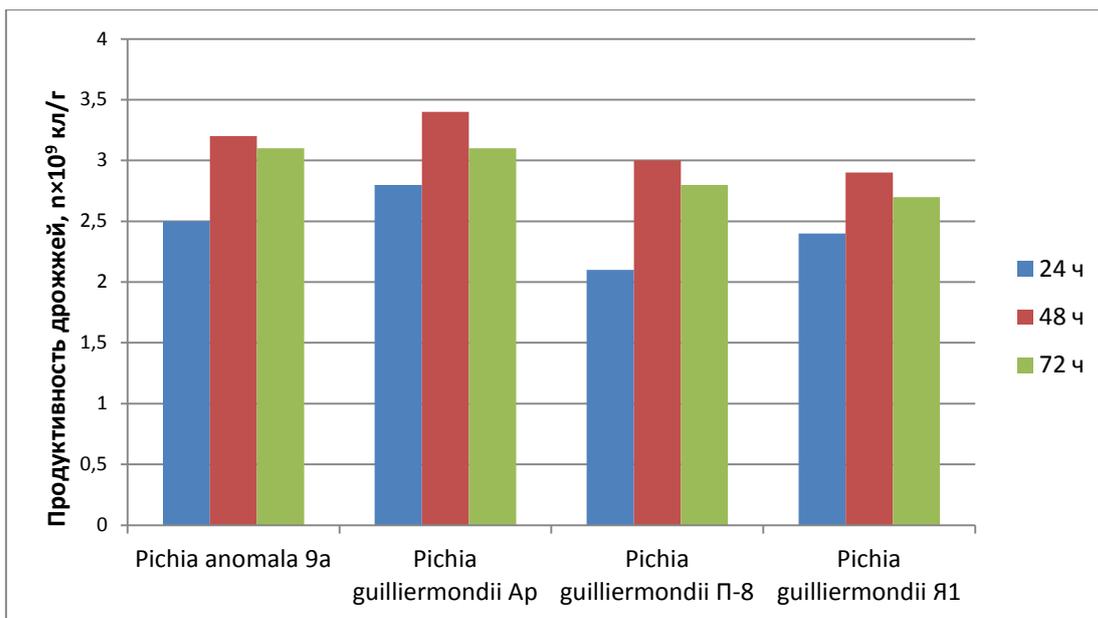


Рисунок 4. Продуктивность дрожжей на соломенной муке

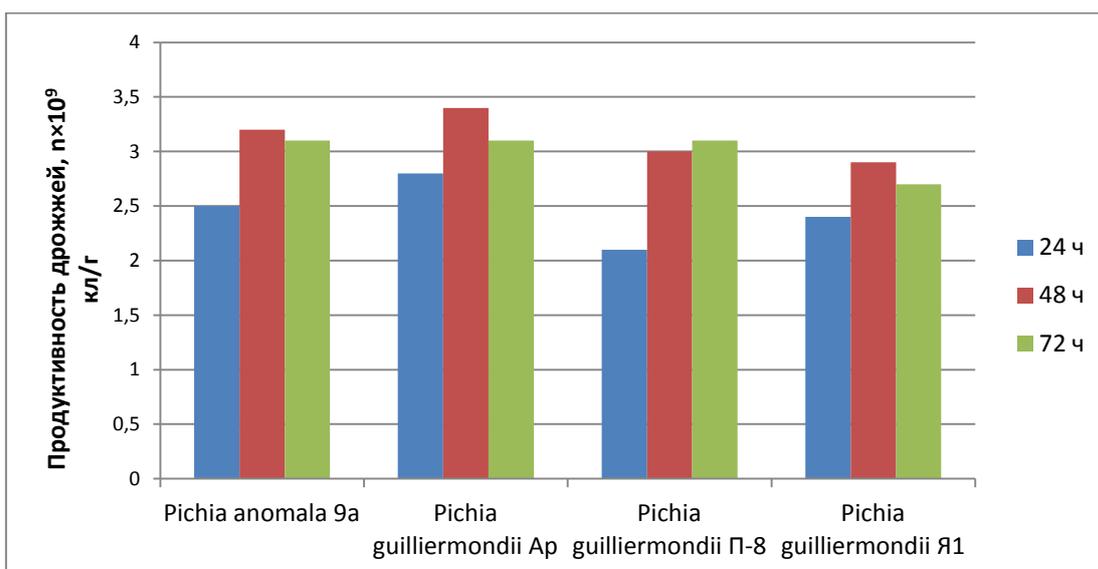


Рисунок 5. Продуктивность дрожжей на сенной муке

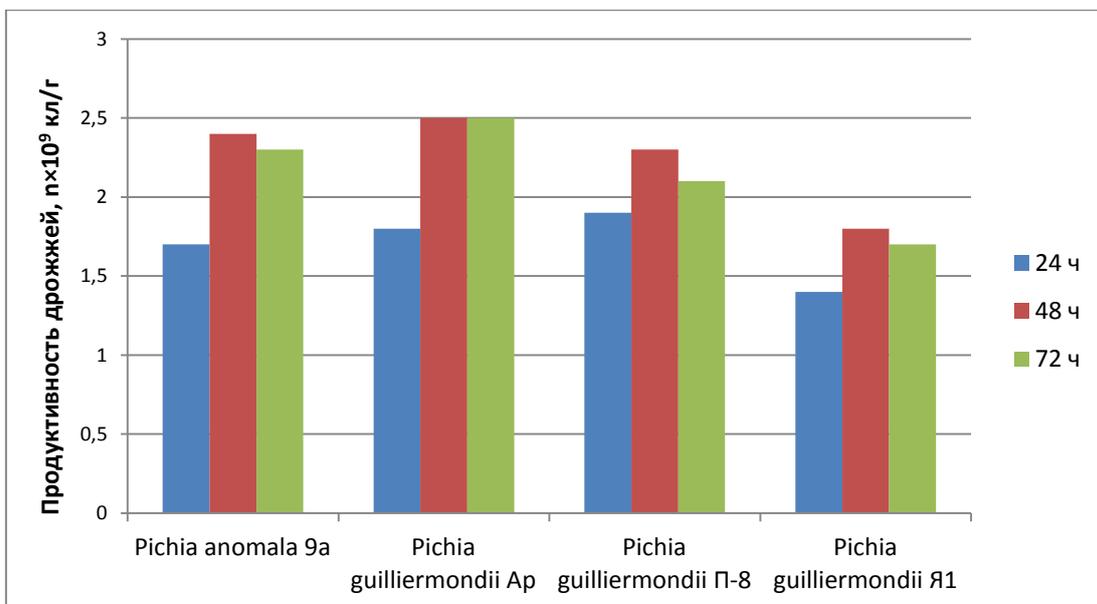


Рисунок 6. Продуктивность дрожжей на кукурузном стебле

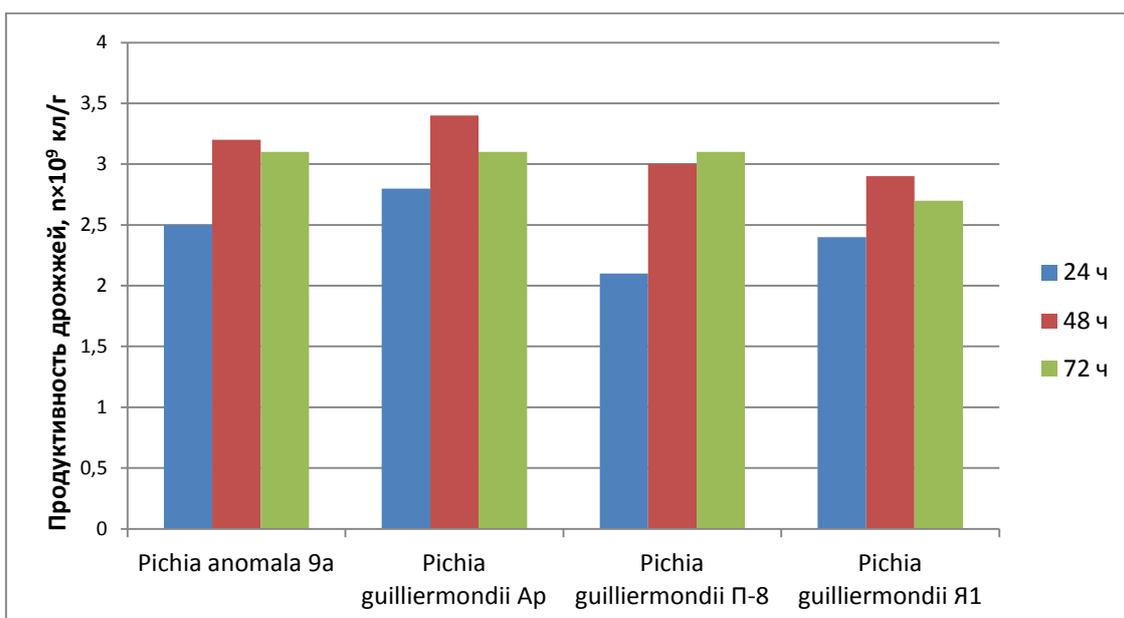


Рисунок 7. Продуктивность дрожжей на травяной муке

На рисунках 4, 5, 6, 7 представлены результаты накопления дрожжей на разных субстратах. Из них достаточно наглядно видно, что эти показатели в целом весьма близки: нарастание числа клеток в культурах на целлюлозосодержащих материалах идет до 72 часов, но все-таки основное количество клеток накапливается за первые 48 часов. Так как при формулировании цели исследования планировалось создать не только

обогащители пищи и кормов, но и совершенно новый продукт для стимулирования роста растительных организмов и почвенных биоценозов, то дальнейшие исследования проводились прежде всего со штаммом *Pichia guilliermondii* Ap, выделенным из натуральной микрофлоры сенной муки. Смыв из твердофазной культуры на сенной муке представлен на рис. 8.



Рисунок 8. Дрожжи *Pichia guilliermondii* Ap (увел.)

## 2.2.2. Конструирование комплексных питательных сред для твердофазной ферментации в процессе производства получаемого продукта

### 2.2.2.1. Использование первичного и вторичного растительного сырья в качестве основы питательных сред

Большую роль в пищевой цепи всего живого играют такие материалы как зерно и продукты его переработки, сено, сенная и травяная мука, жомы, шроты перерабатывающих предприятий, солома колосовых, стебли, листва технических культур и т.п. Некоторые из целлюлозосодержащих субстратов были испытаны в чистом виде в качестве твердофазных питательных сред при выращивании на них дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap.

#### 2.2.2.1.1. Целлюлозосодержащие субстраты как основа твердофазных сред

Целлюлозосодержащие материалы в разных регионах планеты представлены листвой дикорастущих и плодовых деревьев, вторичными и первичными продуктами предприятий агропромышленного комплекса. Дрожжи рода *Pichia* способны накапливать биомассу на самых различных целлюлозосодержащих субстратах.

В таблице 10 представлена интенсивность роста *Pichia guilliermondii* Ap на нескольких субстратах.

Таблица 10. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap на Целлюлозосодержащих субстратах

№ п/п	Название субстрата	Продуктивность дрожжей 10 <sup>9</sup> КОЕ/г		
		24 ч	48 ч	72 ч
1	измельченный кукурузный стебель	1,8	2,5	2,8
2	измельченные сухие листья маниока	0,5	0,3	0,8

3	измельченные сухие листья березы	0,3	0,7	1,1
4	измельченные сухие листья яблони	2,1	2,5	2,4
5	измельченные сухие листья манго	1,8	2,5	2,6
6	рисовая солома	1,6	1,9	2,3
7	овсяные отруби	3,2	4,0	4,2
8	дробленый ячмень	2,9	3,8	3,6
9	Дробленый пророщенный ячмень	4,2	6,8	8,2
10	измельченные сухие листья свеклы	1,2	1,8	2,0
11	измельченные сухие листья груши	0,3	0,9	0,8
12	измельченные сухие листья черной смородины	0,5	1,2	1,0
13	измельченные сухие листья лебеды	1,3	1,8	1,6
14	измельченные сухие листья клена	0,5	1,1	1,1
15	измельченные сухие листья липы	0,7	1,3	1,2
16	Сенная мука	2,6	3,4	3,1

Подводя итог этого этапа работы, следует констатировать, что самые разные целлюлозосодержащие моносубстраты вполне могут быть использованы как питательные среды для твердофазного культивирования дрожжей рода *Pichia*, которые обладают хотя и невысокой, но все же достаточной гидролитической активностью, позволяющей им накапливать весьма ощутимую биомассу и тем самым в определенной степени обогащать биомассу растительную.

### 2.2.2.1.2. Ферментативная активность дрожжей *Pichia* на растительных субстратах

Рост дрожжей *Pichia guilliermondii* Ар на самых трудных для ферментации материалах позволяет предполагать у них способность продуцировать ферменты, расщепляющие самые трудноферментируемые полимеры глюкозы.

Из рисунков 9 и 10 видно некоторое опережение синтеза гидролитических ферментов, за которым следует нарастание числа клеток дрожжей в твердофазных культурах. Если сопоставлять эти результаты с данными таблицы 10, то можно говорить о необходимости предварительного гидролиза полимеров твердофазного целлюлозосодержащего субстрата, за которым следует накопление дрожжевых клеток, т.е. формируется такой целевой продукт как дрожжевая биомасса, обогащающая исходный растительный субстрат.

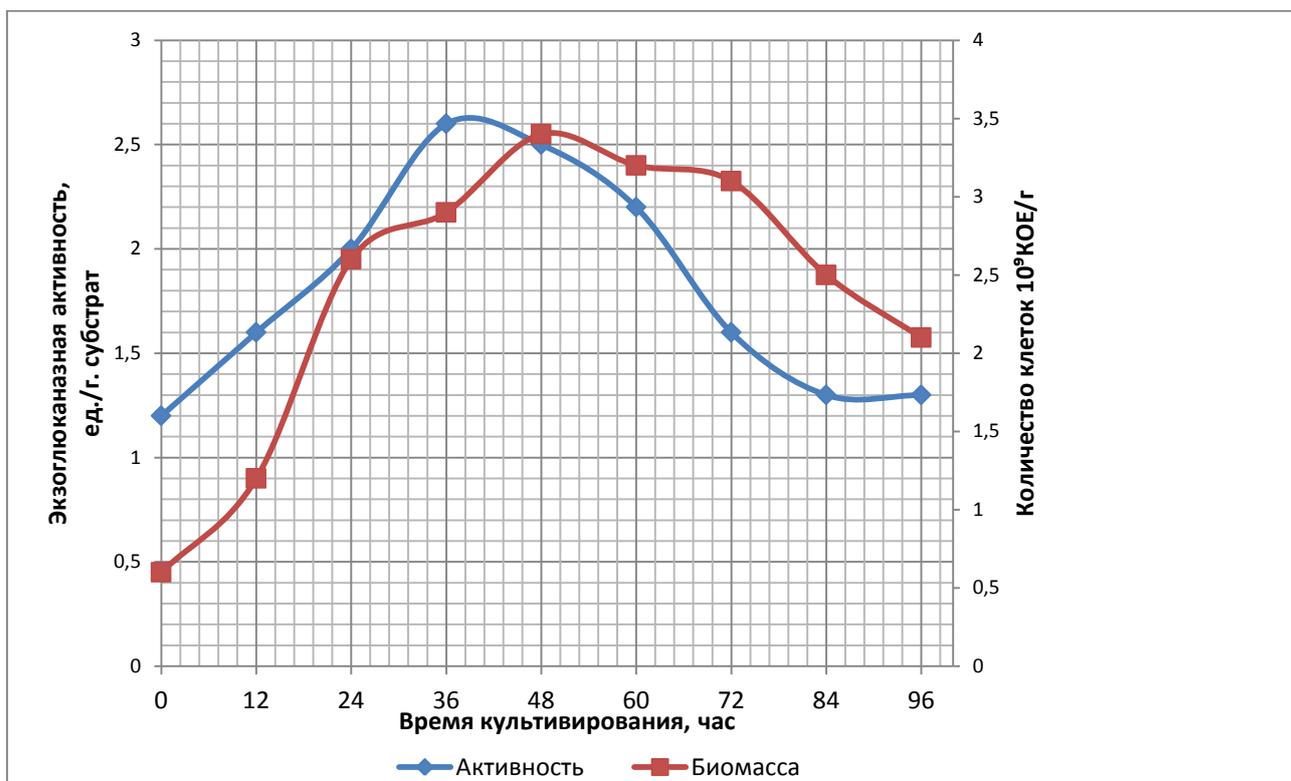


Рисунок 9. Экзоглюканазная активность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ар при ТФФ на сенной муке

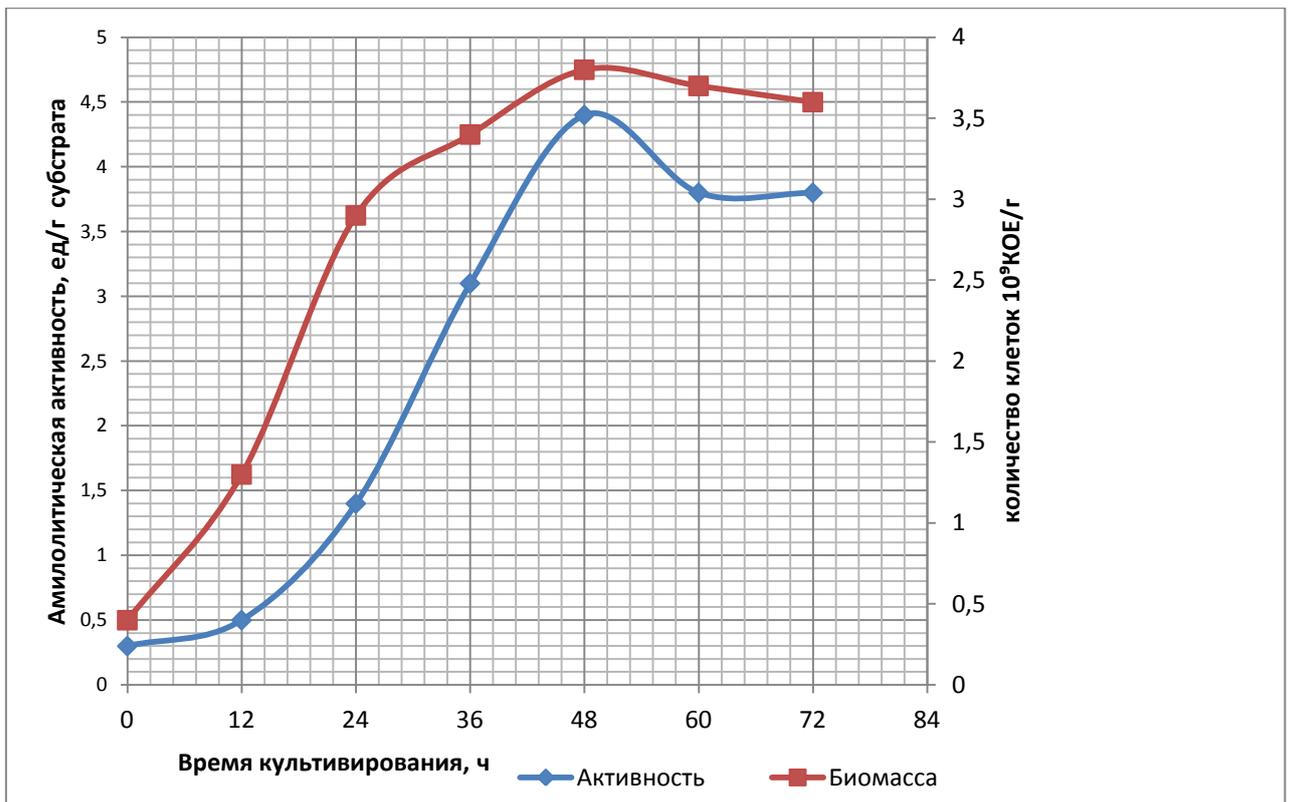


Рисунок 10. Амилолитическая активность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ар при ТФФ на дробленом ячмене

#### 2.2.2.2. Влияние злаковых, бобовых и плодово-овощных добавок на рост микроорганизмов при ТФФ

В пищевой цепи растительноядных животных *in vivo* растительные субстраты обычно подвергаются микробной биоконверсии в виде комплексов, состоящих из целлюлозосодержащих, крахмалистых, углеводистых компонентов. Такие комплексы были сформированы при дрожжевой биоконверсии *in vitro* и в настоящей работе [98, 58].

##### 2.2.2.2.1. Дрожжевая биоконверсия целлюлозно-крахмалистых комплексов

Мука из вегетативной части растения кукурузы представляла для нас особенный интерес, так как именно такое целлюлозосодержащее сырье накапливается в наибольших количествах в зерновом производстве Республики Конго и региона Центральной Африки.

Мука из измельченного кукурузного стебля смешивалась с различными крахмалистыми продуктами в соотношении 1:1, увлажнялась и засеивалась водной суспензией дрожжей до 50%-ной влажности и концентрации дрожжевых клеток  $\approx 1 \cdot 10^8$  /г влажной культуры. На рисунках 11, 12, 13 представлены результаты ферментации комплексных субстратов. Результаты в целом свидетельствуют о достаточно скромной амилолитической активности используемого штамма. Ранее другие изучавшиеся в МГУПП штаммы дрожжей *Pichia* также характеризовались весьма низкой способностью потреблять крахмалистые продукты.

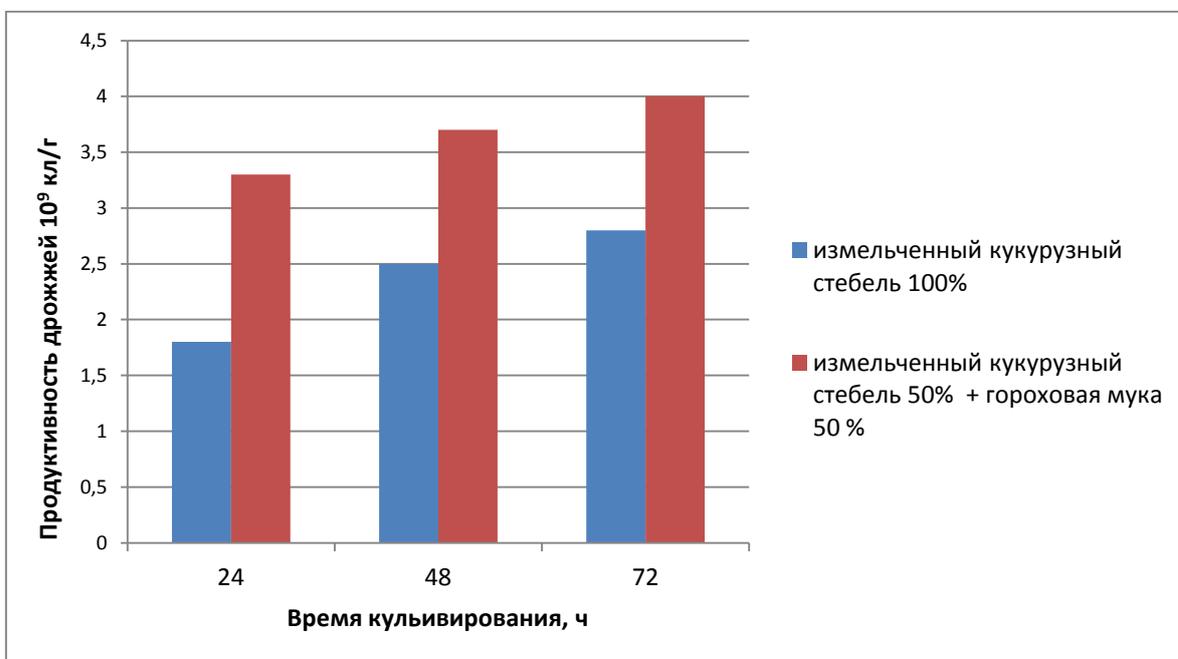


Рисунок 11. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и гороховой муке

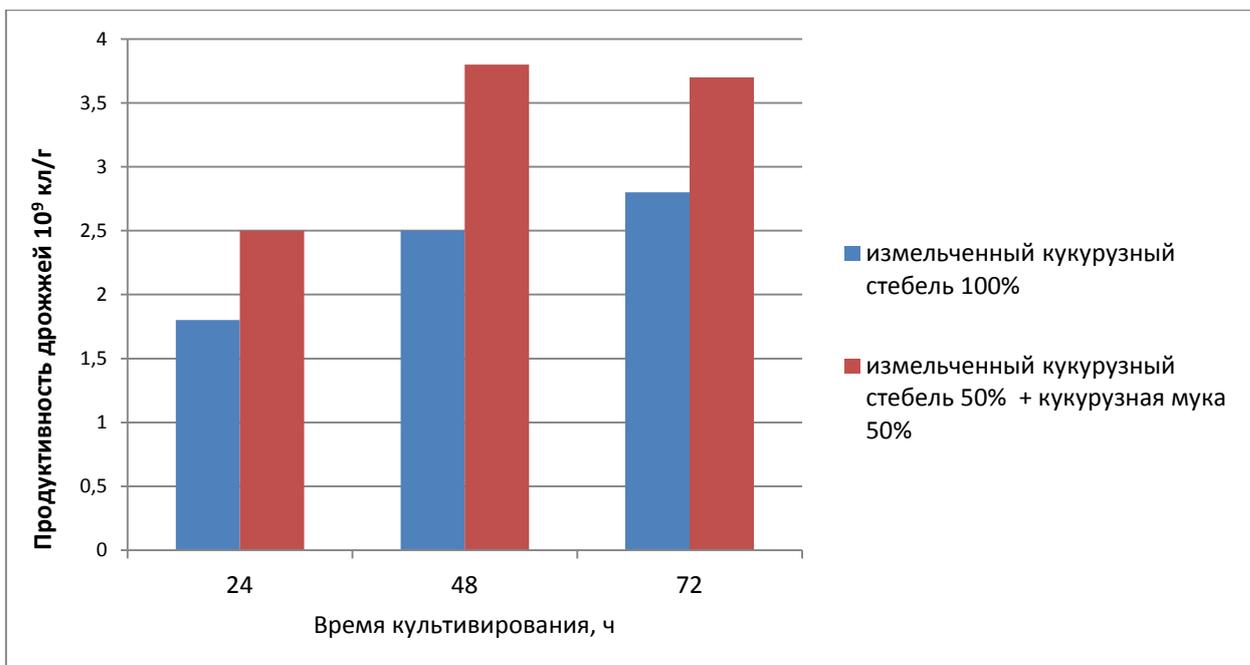


Рисунок 12. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и кукурузной муке

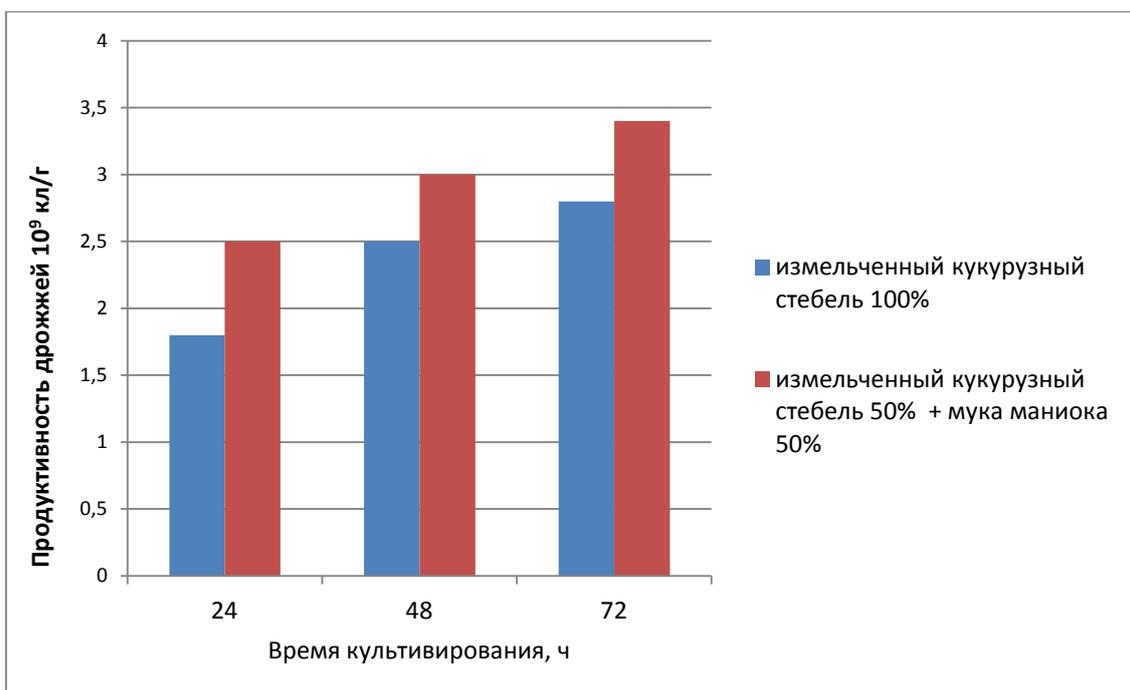


Рисунок 13. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и муке маниока

#### 2.2.2.2. Дрожжевая биоконверсия целлюлозно-углеводистых комплексов

Ферментация углеводистых продуктов осуществлялась по несколько другой схеме. Измельченный кукурузный стебель смешивался с полужидкими и влажными углеводистыми материалами и с посевной культурой до достижения влажности 50-60% и концентрации дрожжей  $\approx 1 \cdot 10^8$  клеток/г. Соотношение целлюлозосодержащего компонента и углеводистого материала по сухому веществу колебалось в интервале 1:1 или 2:3. Интенсивность роста дрожжей на таких комплексных средах была заметно выше, чем на комплексах с крахмалистыми материалами (рис. 14-21).

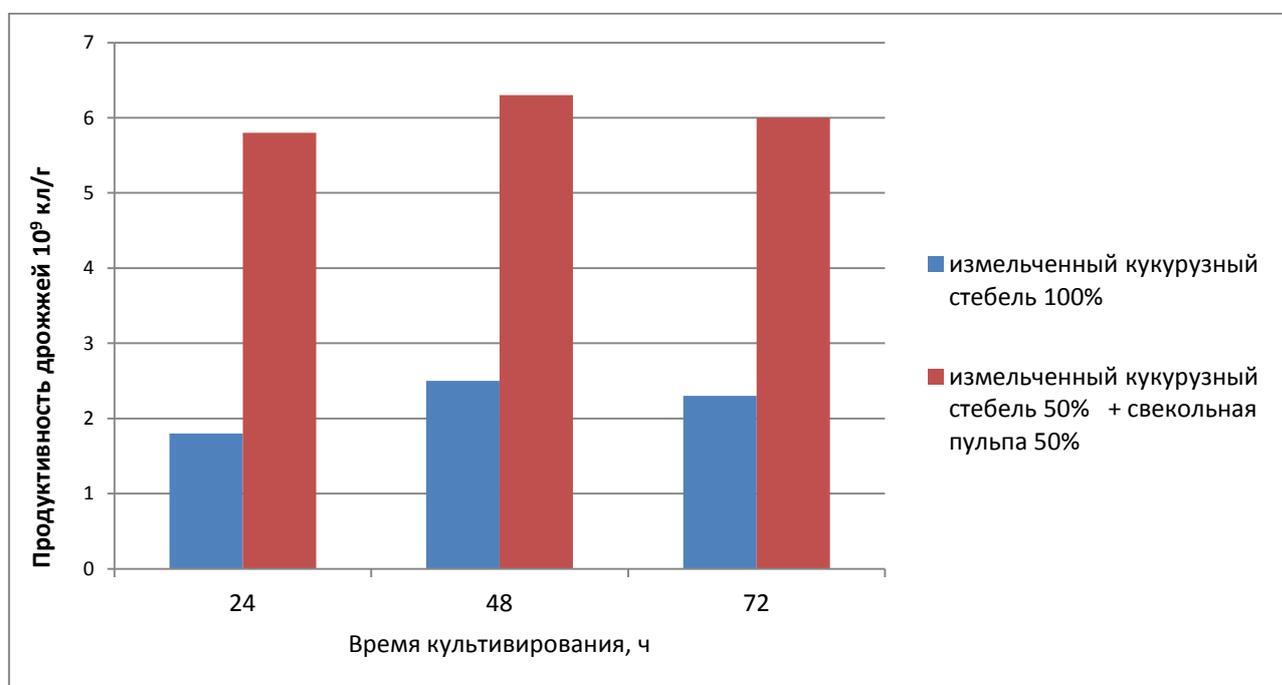


Рисунок 14. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и свекольной пульпе

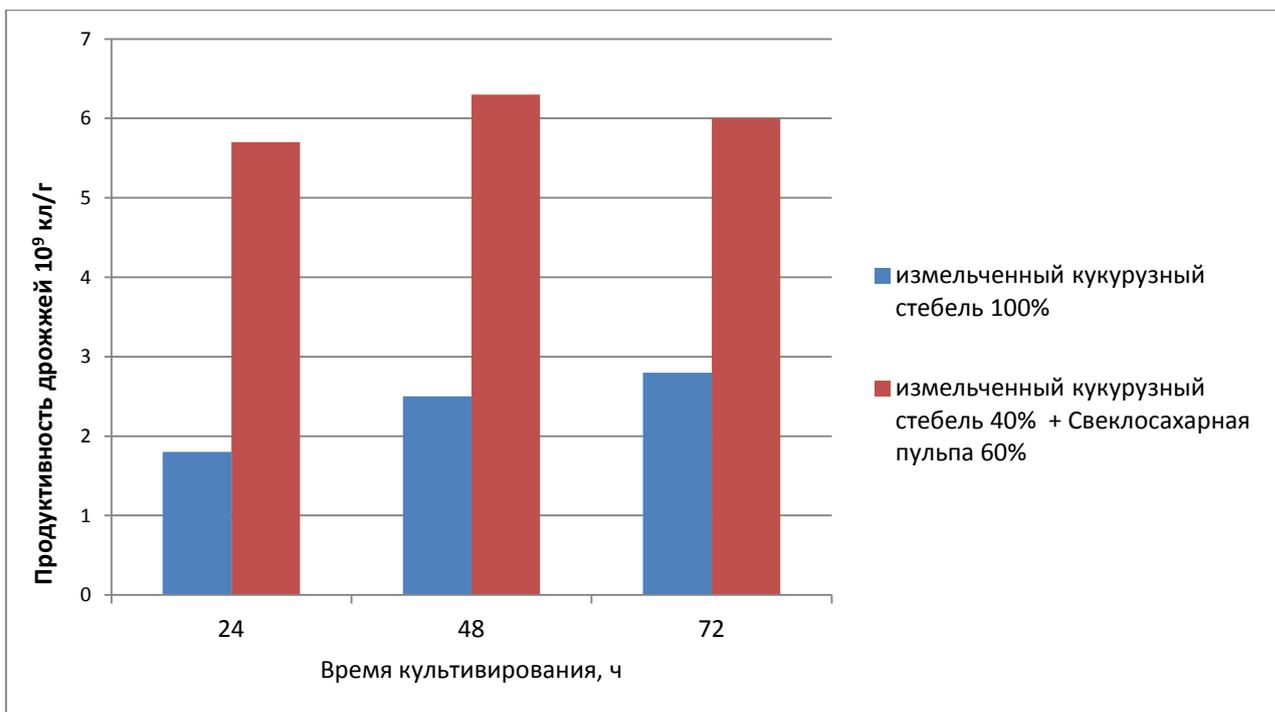


Рисунок 15. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и свеклосахарной пульпе

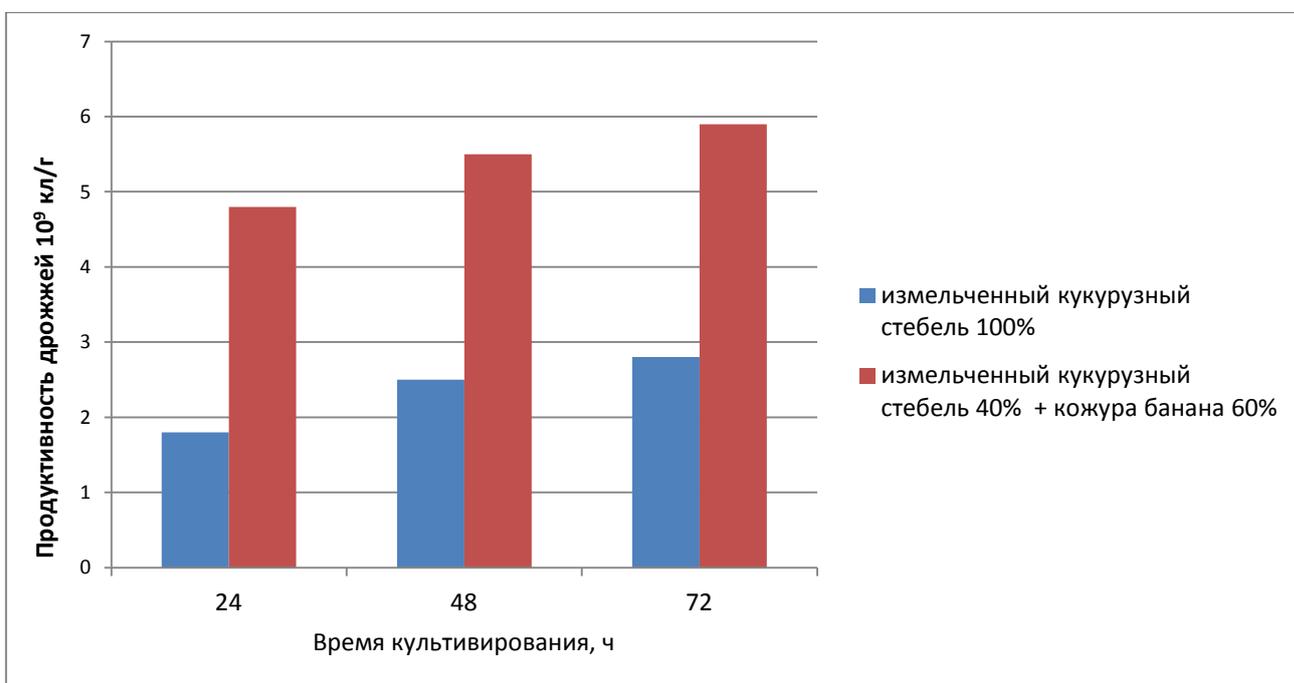


Рисунок 16. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и кожуре банана

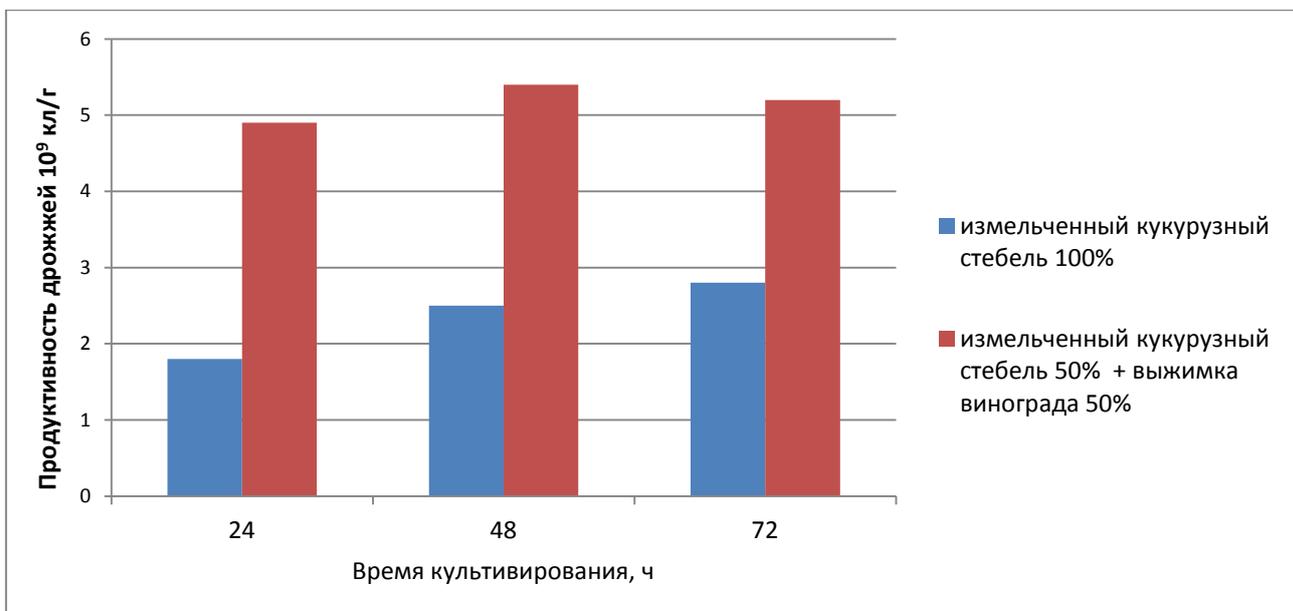


Рисунок 17. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и выжимке винограда

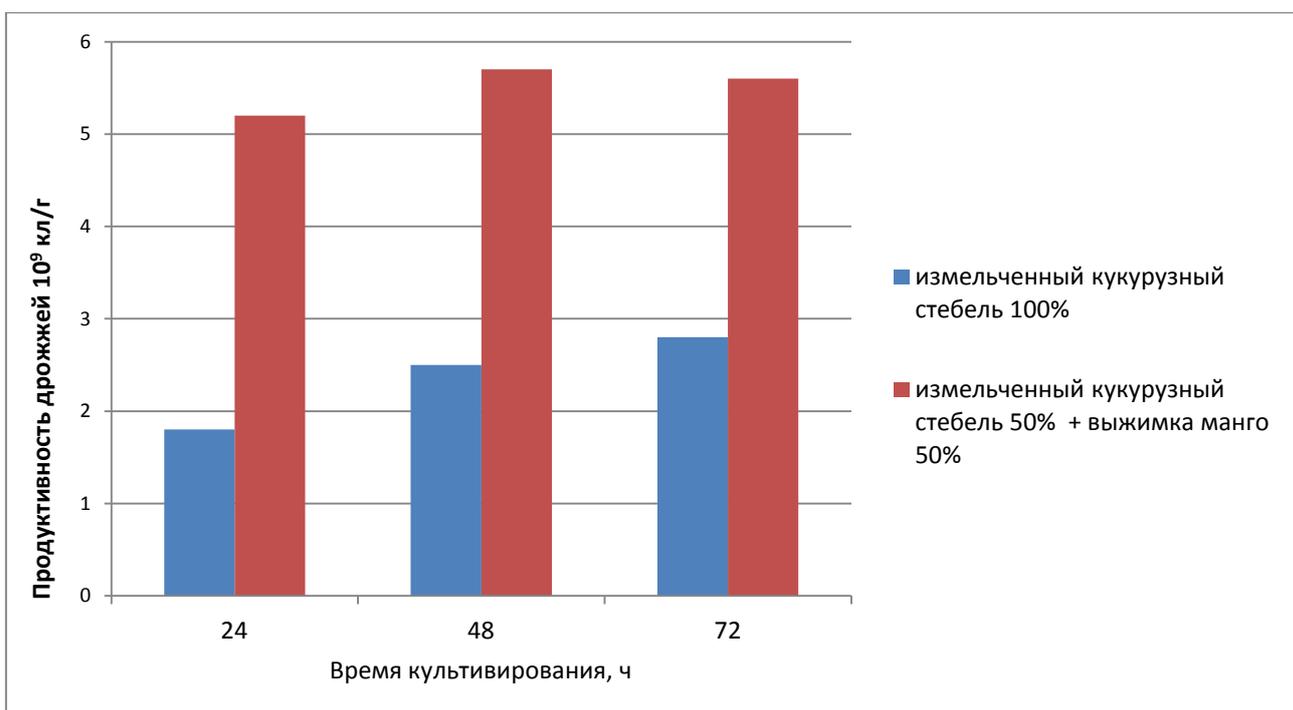


Рисунок 18. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и выжимке манго

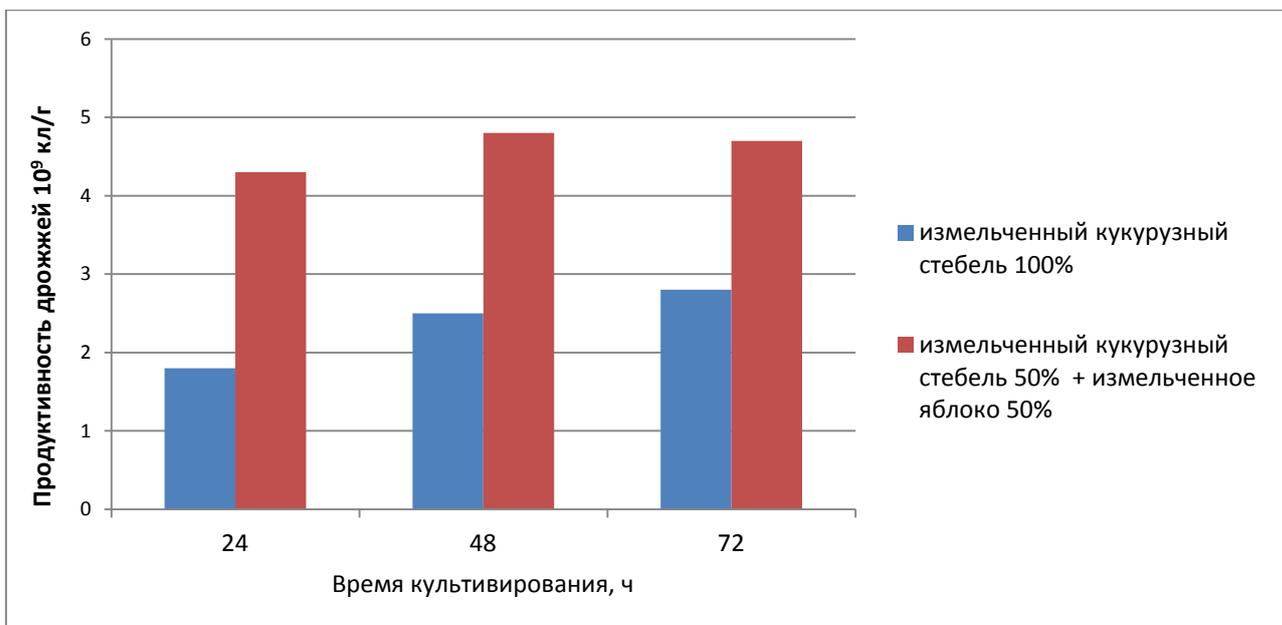


Рисунок 19. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и измельченном яблоке

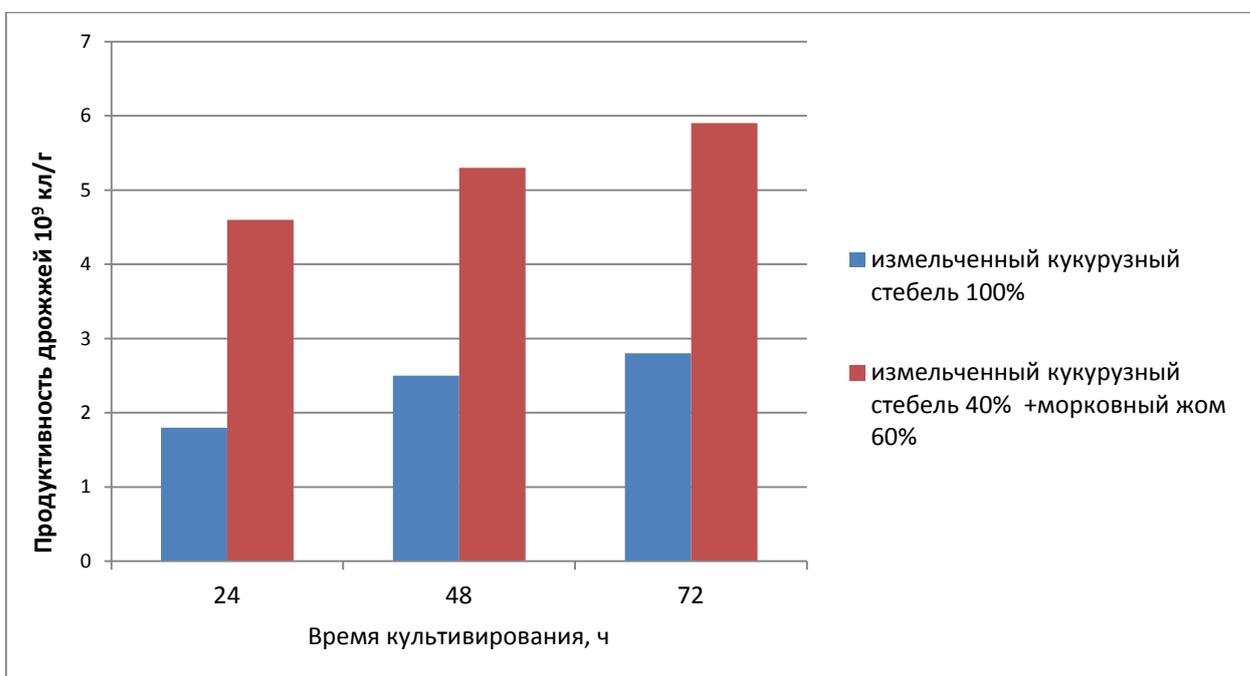


Рисунок 20. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на измельченном кукурузном стебле и морковном жоме

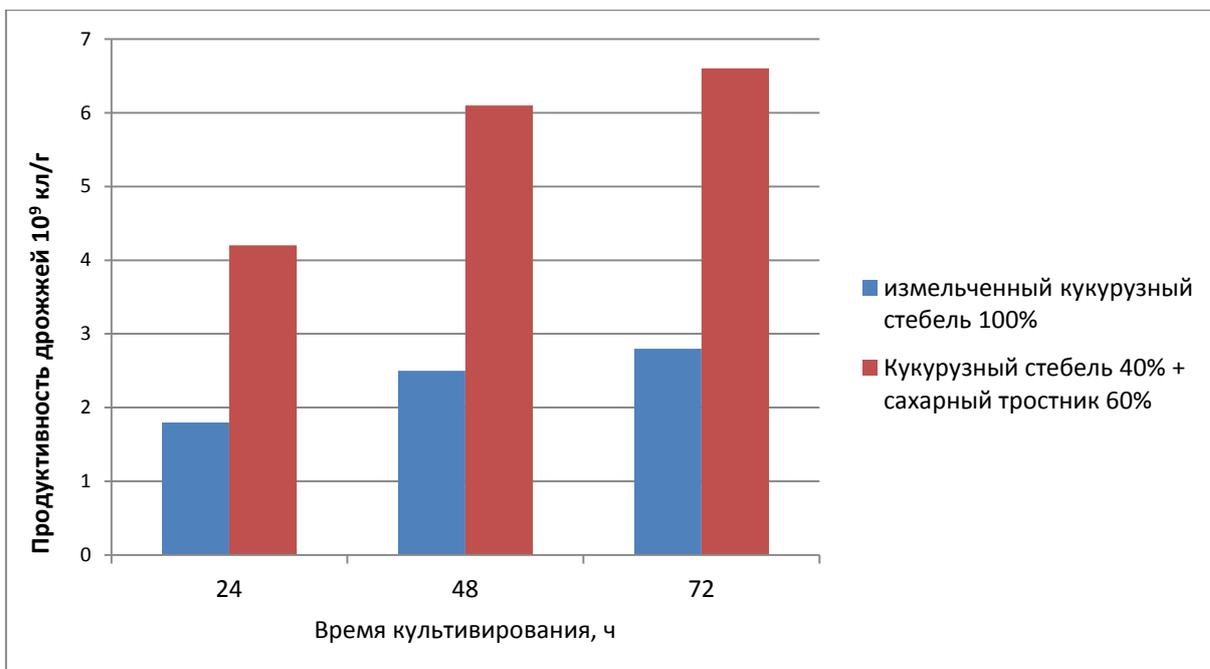


Рисунок 21. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap на кукурузном стебле и сахарном тростнике

Практически все углеводистые материалы очень интенсивно стимулируют рост дрожжей *Pichia guilliermondii* на целлюлозном субстрате. Самая низкая продуктивность дрожжей на комплексе с яблочным обогатителем объясняется скорее всего чрезмерным закислением среды, что уже отмечалось ранее в литературе [24].

Таки образом, при конструировании твердофазных питательных сред для дрожжей рода *Pichia* наиболее значимыми компонентами являются целлюлозосодержащий носитель, лучше пористый, и различные углеводистые материалы как наиболее активные стимуляторы роста.

### 2.2.2.3. Некоторые физические параметры твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащих субстратов дрожжами рода *Pichia*

#### 2.2.2.3.1. Влияние температуры на рост дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap

Каждый живой организм имеет какую-то оптимальную температуру для активирования его ферментов и всех присущих для него обменных процессов.

Источник выделения используемых в нашей работе дрожжей-суперпродуцентов биомассы обуславливает определенную термотолерантность штамма. Результаты исследования роста дрожжей на овсяных отрубях показаны на рисунке 22.

Видно, что температурный оптимум роста дрожжей находится в пределах 29-31°C, дальнейшее повышение температуры приводит к постепенному падению продуктивности.

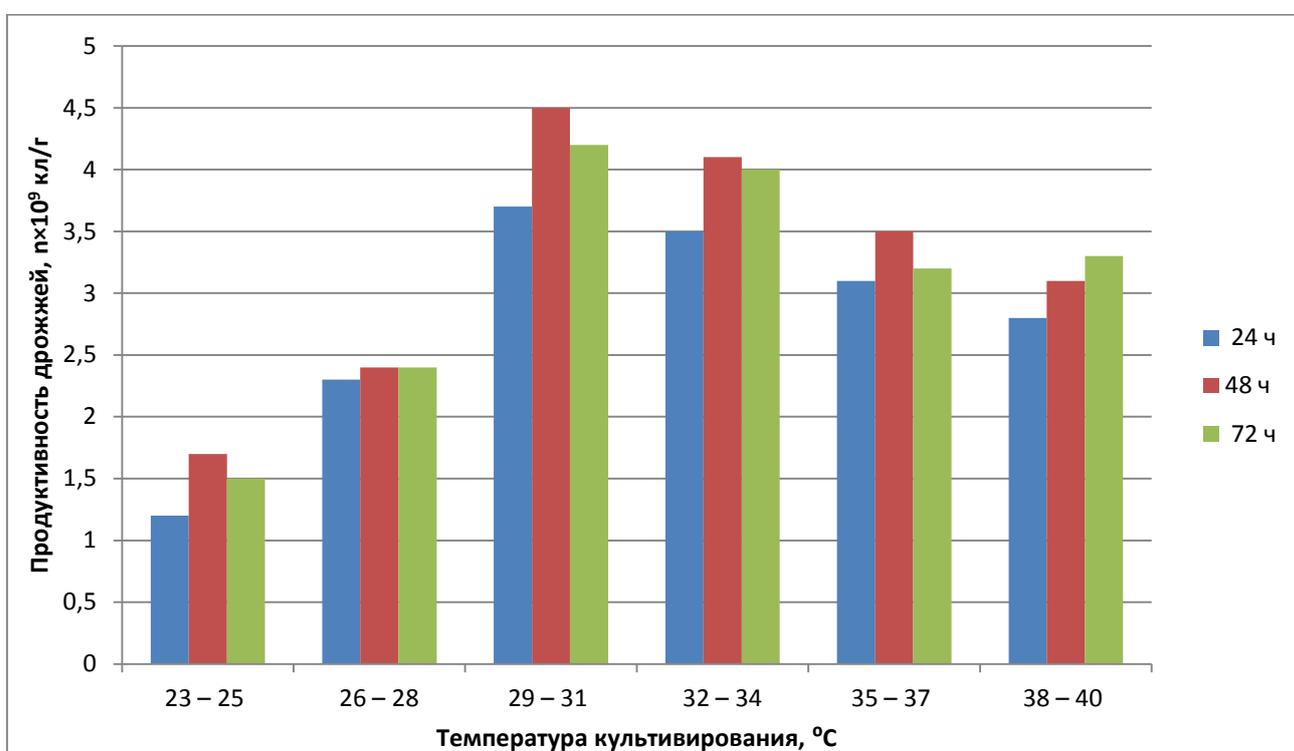


Рисунок 22. Выращивание дрожжей на овсяных отрубях

#### 2.2.2.3.2. Влажность целлюлозосодержащих субстратов как фактор стимулирования роста микроорганизмов

Значительно более интересными оказались данные о влиянии влажности разных целлюлозосодержащих субстратов на продуктивность дрожжей. Отмечается значительная разница по продуктивности разных субстратов в зависимости от их влажности [рисунок 23, 24].

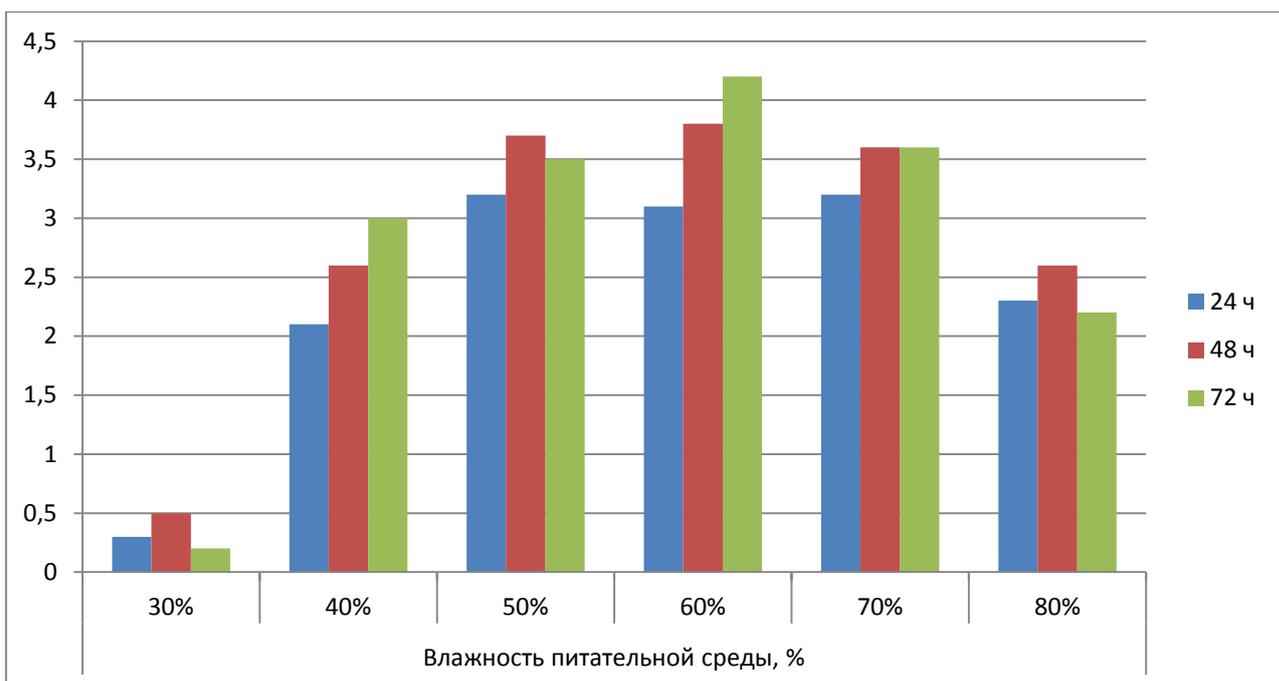


Рисунок 23. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на травяной муке

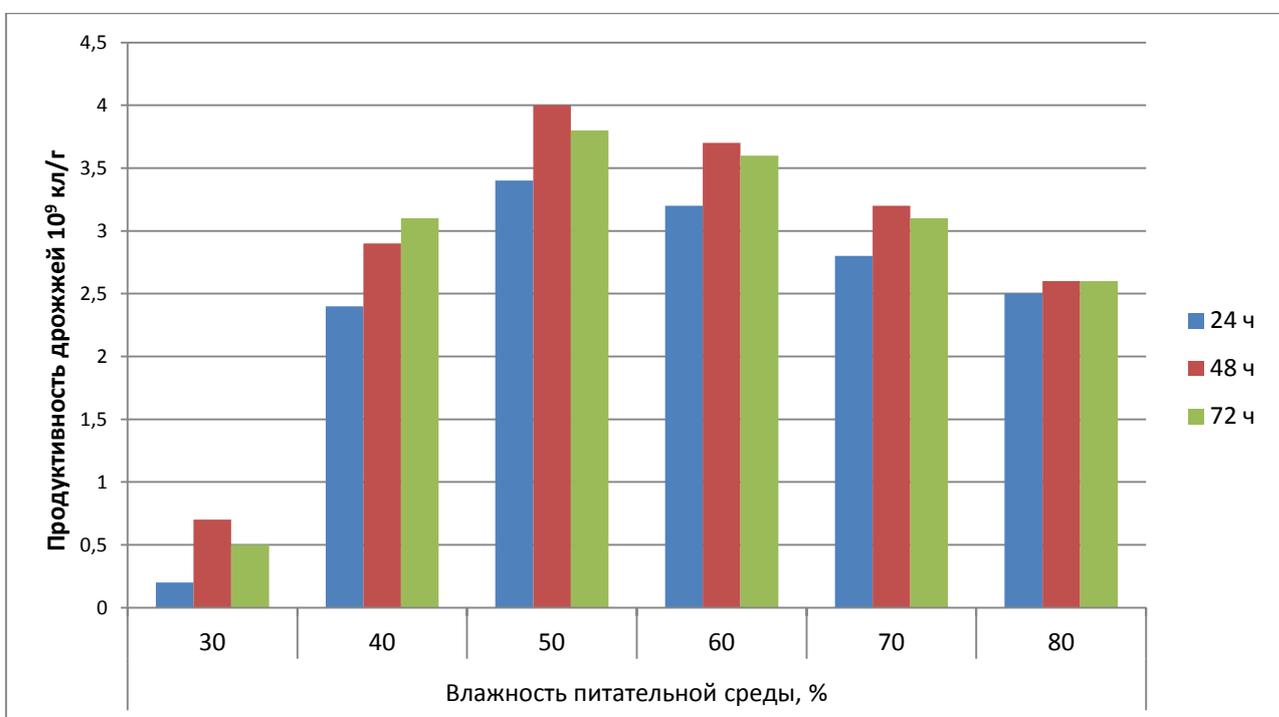


Рисунок 24. Продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ar на овсяных отрубях

Способность удерживать воду при повышенной влажности обеспечивает более высокую удельную продуктивность высокопористых субстратов по сравнению с менее пористыми.

### 2.2.2.3.3. Влияние перемешивания и аэрации на продуктивность дрожжей

Для проверки влияния на продуктивность дрожжей эффекта перемешивания при ТФФ на твердую питательную среду заседали дрожжи *Pichia guilliermondii* Ap.

№1- контроль не перемешивали.

№2- перемешивали каждые 30 мин.

№3- перемешивали каждый час.

№4- перемешивали каждые два часа.

№5- перемешивали каждые 4 часа.

Опыт продолжился 24 часа, результат представлен на рисунке 25.

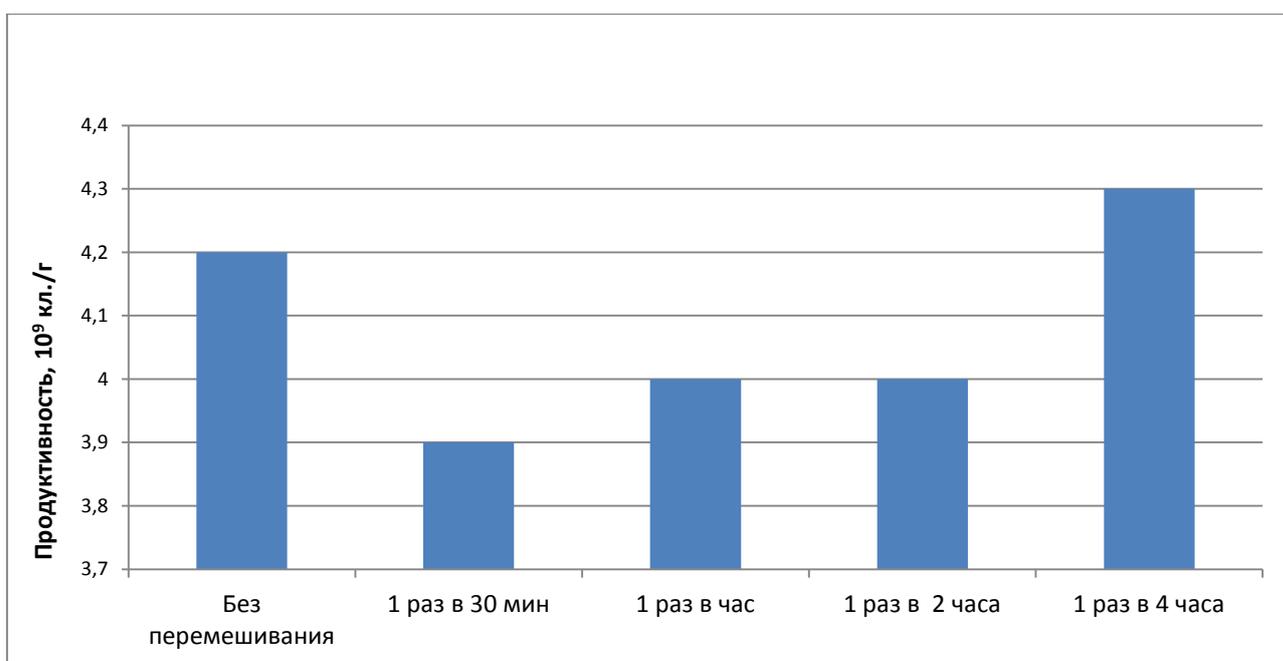


Рисунок 25. Влияние различных режимов перемешивания на продуктивность дрожжей на овсяных отрубях

При перемешивании один раз в 2 часа и один раз в 4 часа, продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap находится почти на уровне контроля. Соответственно ферментацию при ТФФ возможно вести и без перемешивания, то есть приемлемыми могут быть установки и с перемешиванием растущей культуры, и без такового. Однако оптимальный режим перемешивания будет очень полезно знать при конструировании новых пока еще не существующих установок для твердофазной ферментации растительного сырья дрожжами. Если это будет многоэтажная этажерка из движущихся горизонтально ленточных транспортеров, то оптимальная продолжительность удержания ферментируемого материала на каждом этаже установки будет составлять 2-4 часа, а это в свою очередь позволит рассчитать количество полос такого ленточного транспортера.

### **2.2.3. Глубинные дрожжевые культуры как посевной материал в современном биотехнологическом производстве.**

Крупнотоннажное производство нутриентов кормового назначения в СССР представляло собой глубинное культивирование дрожжей с перемешиванием и аэрацией на различных жидких субстратах (гидролизатах целлюлозосодержащих материалов, на жидких углеводородах нефти, на жидких отходах некоторых пищевых производств и т.п.) Производства подобного рода свою деятельность практически прекратили.

Производство микробных нутриентов методом твердофазного культивирования и в первую очередь ферментированных пищевых продуктов в России никогда не было, хотя небольшие ферментные заводы с твердофазным культивированием микроорганизмов в СССР работали достаточно долго. Производительность этих предприятий также практически сошла на нет, а пищевая промышленность в основном перешла на импортные ферментные препараты.

Мы прекрасно представляем все те трудности, которые могут ожидать технологию, представленную в разделах 2.2.2.2.1 и 2.2.2.2.2. Твердофазная ферментация, которая идет достаточно просто в асептических условиях в чашках Петри, в перфорированных кюветах и автоклавных боксах при масштабировании процесса обязательно будет подвергнута обсеменению микрофлорой из окружающей среды. Твердофазная ферментация в течение 72 часов (и даже иногда и после 48 часов), тем более при периодическом контроле растущих культур даже в лабораторных условиях при соблюдении всех правил асептики, сопровождается появлением посторонней микрофлоры и прежде всего микроскопических грибов. Естественно, при стерильном культивировании в закрытых аппаратах такое явление не может проявляться. Но реально подобное развитие процесса будет наблюдаться при глубинном культивировании. Как можно использовать преимущества глубинного культивирования и избежать осложнений твердофазного культивирования мы попытались понять при формировании новой нестандартной технологической цепочки.

### **2.2.3.1. Глубинное культивирование дрожжей на гетерогенных углеводистых средах**

В разделе 2.2.2.2.2. уже было отмечено выраженное стимулирующее влияние углеводистых компонентов на рост дрожжей на комплексных целлюлозосодержащих углеводистых субстратах. На рисунке 26 представлены данные по накоплению дрожжей на разных овощных пульпах, разбавленных водой в соотношении 1 : 2 за 48 часов глубинного культивирования в колбах на качалке при 220 об/мин и температуре  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ . И хотя концентрации сухих веществ в таких импровизированных средах практически не превышают 5-6%, продуктивность этих сред почти достигает  $2 \cdot 10^9$  клеток/мл, что предполагает возможность использовать и такие посевные материалы в процессах биоконверсии растительного сырья.

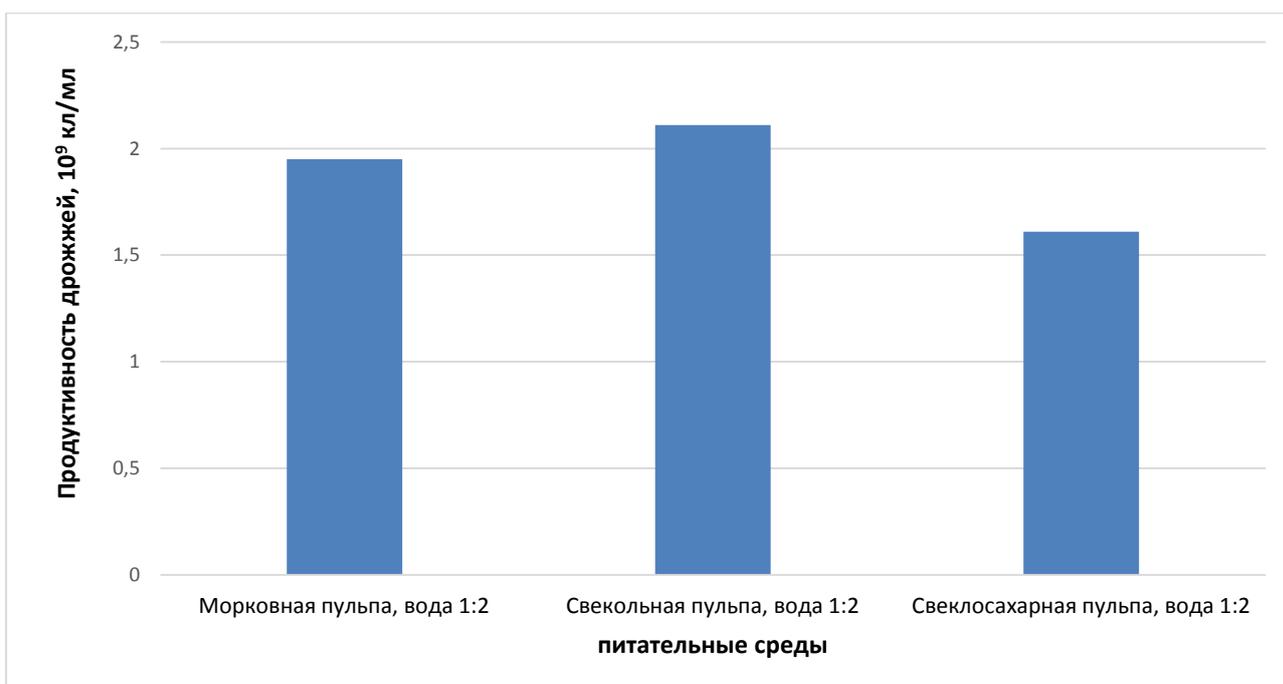


Рисунок 26. Продуктивность дрожжей рода *Pichia guilliermondii* Ap на овощных средах за 48 часов ферментации

Особый интерес представляет возможность глубинного культивирования дрожжей на свекольной пульпе. Однако приведенные экспериментальные данные свидетельствуют о довольно близких результатах накопления дрожжей и на других жидких субстратах (рис. 26).

### **2.2.3.2. Последовательное глубинно-твердофазное культивирование дрожжей на комплексных растительных субстратах.**

Результаты предшествующих разделов работы (2.2.2.2.1 и 2.2.2.2.2) свидетельствуют о том, что трехсуточное твердофазное культивирование дрожжей на простерилизованных растительных субстратах даже в лабораторных условиях сопровождается периодическим появлением посторонней (прежде всего грибной) микрофлоры. При этом, чем богаче твердофазная питательная среда, тем больше вероятность появления мицелия гриба на поверхности растущих твердофазных культур. Однако достаточно многочисленные литературные данные указывают на антимикробное (прежде всего антимикотическое) действие многих грибов рода *Pichia* [98, 58]. В какой-то мере ситуацию облегчает тот факт, что за 48 часов концентрация дрожжей в

твёрдофазных культурах практически выходит на максимум. Следовательно, процесс твёрдофазного культивирования можно ограничить 48 часами. В данной работе была сделана попытка увеличить чистоту получаемой дрожжевой культуры и надёжность этого процесса. На рисунке 27 представлены результаты комплексного глубинно-твёрдофазного культивирования, вначале выращенных глубинно на стерильной свекольной пульпе в течение 48 часов, а затем дорощенных на твёрдых целлюлозосодержащих субстратах в течение 48 часов с влажностью 60%.

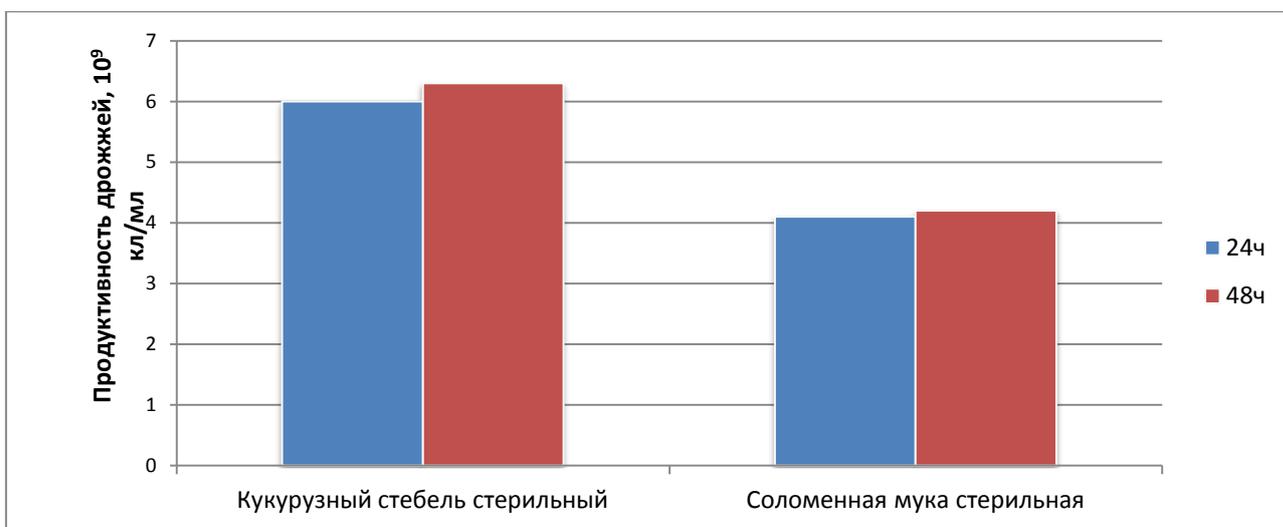


Рисунок 27. Накопление дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap на твёрдых субстратах с посевным материалом на базе свекольной пульпы

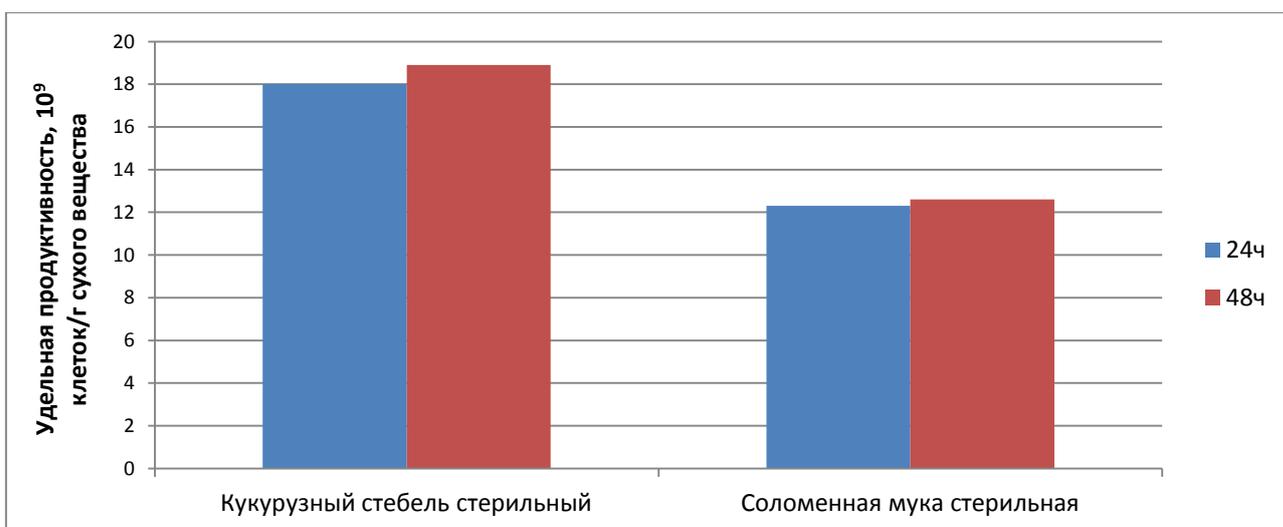


Рисунок 28. Удельная продуктивность дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap на твёрдых субстратах с посевным материалом на базе свекольной пульпы

Рисунок 28 достаточно четко показывает зависимость продуктивности дрожжей от используемого целлюлозосодержащего субстрата. Но если посмотреть на удельную продуктивность этих субстратов, то по этому показателю разница между этими субстратами очень серьезно сглаживается. Поэтому вполне можно отметить, что накопление дрожжей можно вести на очень широком круге целлюлозосодержащих материалов. Причем по времени при такой большой посевной дозе (более  $1 \cdot 10^9$  КОЕ на 1 г твердофазной культуры) сам процесс твердофазного культивирования можно сократить до 24 часов. При такой продолжительности стерильного твердофазного культивирования мы никогда ни визуально, ни микроскопически не видели в культурах следов роста посторонних микроорганизмов.

#### **2.2.4. Взаимодействие дрожжей и азотобактера в процессе производства получаемого продукта при ГТФ.**

Для получения продукта – стимулятора роста растений с дрожже-бактериальной ассоциацией смешивали измельченный кукурузный стебель с посевным материалом из свекольной пульпы с дрожжами и клетками азотобактера, ферментировали субстраты 72 часа при температуре  $t=30^{\circ}\text{C}$  и 50%-ной влажности. Динамика роста дрожжей и азотобактер представлен на рисунке 29.

Выбор нами кукурузного стебля как основного целлюлозосодержащего субстрата для получения продукта связан с тем, что кукуруза является одним из самых распространенных растений в Африке. Ее зерно часто используют в агропромышленном производстве, а ее стебель и листья просто выбрасываются или сжигаются. На генеральной ассамблее ООН 2015 было сказано, что сельское хозяйство является мотором будущей экономики стран Центральной Африки [124]. В связи с этой тенденцией мы пытались разработать технологию биоконверсии дешевого растительного сырья, то есть кукурузных стеблей, как субстрата для получения микробно-растительных нутриентов кормового или почвенного назначения.

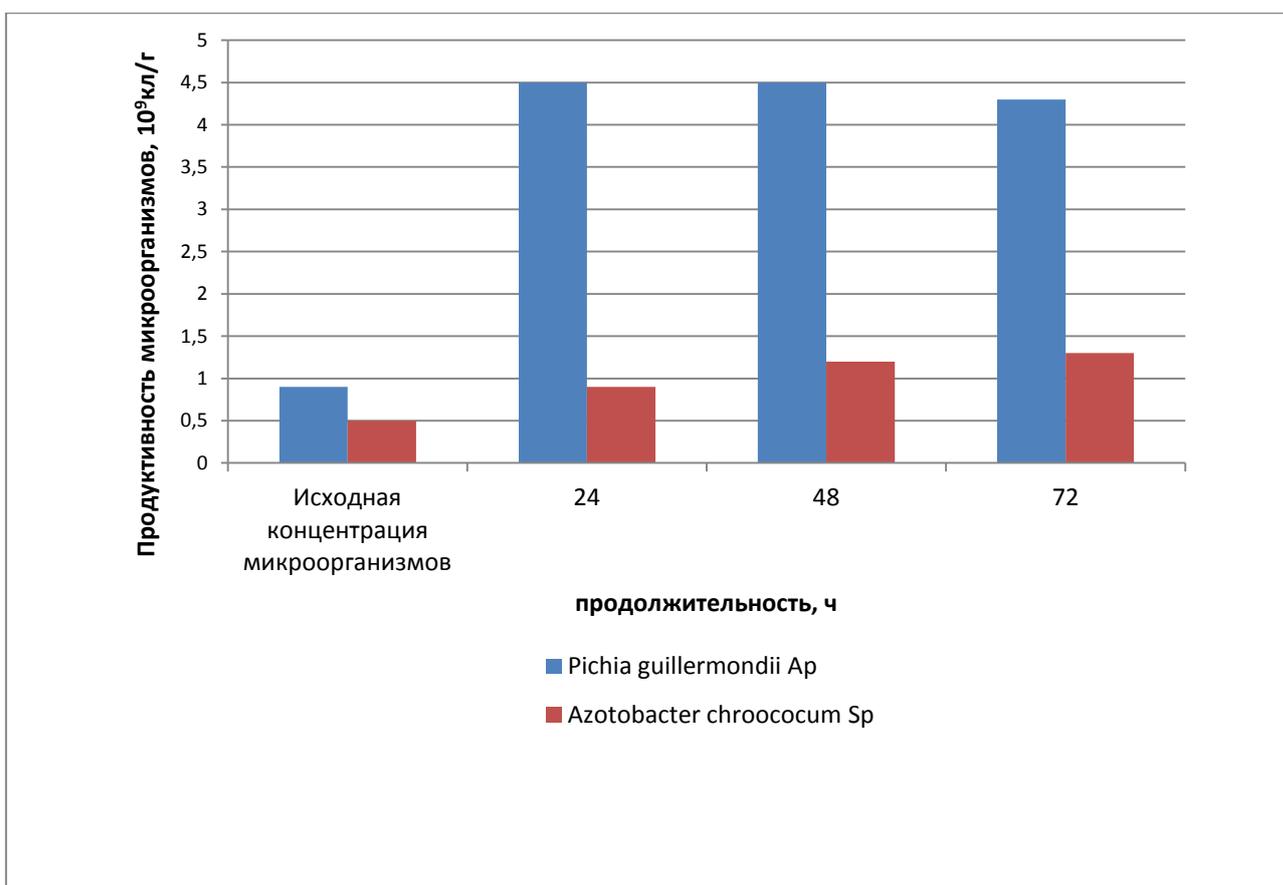


Рисунок 29. Динамика роста микроорганизмов при аэробном культивировании

В процессе аэробной ферментации формируются положительные условия для развития дрожжей и азотобактера, и, по-видимому, они не подавляют развитие друг друга, а находятся в симбиотических отношениях, то есть между ними нет антагонизма.

Как известно, в аэробных условиях спиртовое брожение подавляется, и дрожжи переключаются на аэробное дыхание с образованием конечных продуктов  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ , при этом почти в 2 раза возрастает выход биомассы. Это выгодно для кормовых целей.

Азотобактер как свободноживущий диазотроф в богатом парниковом грунте переходит на питание связанным азотом и проявляет способности продуцировать витамины и другие биологически активные соединения. Некоторые из них обладают фунгистатической активностью против условно патогенных грибов. Азотобактер образует антибиотик анисомицин, открытый

Е.Н. Мишустиним и В.Г. Марьенко на кафедре микробиологии МСХА имени К.А. Тимирязева.

Азотобактер является высоко требовательным к почвенным условиям, хорошо растет в гумусированных гидроморфных почвах, при нейтральной или близкой к нейтральной реакции среды, умеренной влажности и обеспеченности фосфором, кальцием и молибденом.

Эффект составленного удобрения (дрожжей и азотобактера) связан с приспособленностью дрожжей к жизни в почвенной среде. Они не способны к брожению и используют углеродные субстраты только путем прямого окисления. При этом большая часть потребляемого углерода переводится в запасные внутриклеточные липиды и в капсульные полисахариды. Дрожжи выделяют в среду гидролитические ферменты, расщепляющие различные связи в сложных соединениях, оказывают влияние на структурные свойства почвы и, возможно на молекулы гумусовых веществ. То есть полисахариды выступают как комплексообразователи и могут использоваться другими бактериями в качестве углеродного субстрата (в частности, для азотобактера).

Нами создается продукт с бактериально-дрожжевыми азотфиксирующими ассоциациями, полученный на измельченном кукурузном стебле со свекольной пульпой при ферментации в течение 3 суток при температуре  $t=30^{\circ}\text{C}$  при 50%-ной влажности.

#### **2.2.4.1. Изменение активной кислотности в суспензии при росте ассоциации *Pichia guilliermondii* Ap и *Azotobacter chroococcum* Sp на твердофазной среде при аэробном культивировании**

В процессе аэробного культивирования при получении продукта наблюдаются следующие процессы: за 72 часа активная кислотность уменьшается очень мало, а после 72 часов почти не изменяется (рисунок 30). Это указывает на то, что полученный нами продукт имеет почти нейтральный

показатель рН, то есть он более подходит для близких к нейтральной среде почвенных условий.



Рисунок 30. Динамика активной кислотности получаемого ферментированного микробного нутриента.

#### 2.2.4.2. Динамика нарастания сырого протеина в продукте

На рисунке 31 наглядно видно, что при внесении дрожжевых клеток и бактерий процентное содержание сырого протеина увеличивается на 50%, это говорит о том, что микробный протеин может оказывать полезное стимулирующее действие на рост любых живых организмов.

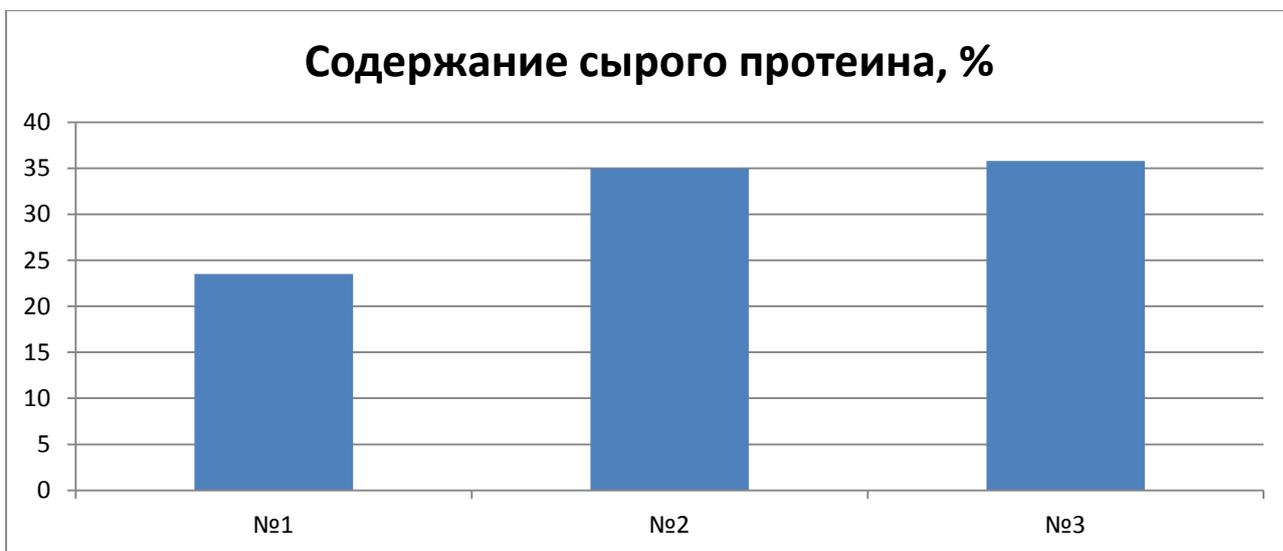


Рисунок 31. Процентное содержание сырого протеина в продукте

№1: контроль - стерильный измельченный кукурузный стебель и свекольная пульпа, доведенные до 50%-ной влажности.

№2: Опыт №1 + засев культуры дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap, проинкубированный 48 ч при глубинно-твердофазном культивировании, t=30°C.

№3: Опыт №1 + засев культуры дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap и бактерий рода *Azotobacter chroococcum* Sp, проинкубированный 72 ч при t=30°C.

### 2.2.4.3. Динамика нарастания аминокислот в продукте

Более интересной в этом этапе является динамика аминокислотного состава. В таблице 11 видно, что в процессе дрожжевой биоконверсии аминокислоты нарастают на 20-30%, хотя глутаминовая кислота нарастает весьма незначительно. Эта динамика позволяет сделать вывод о том, что получаемые продукты могут быть использованы при производстве нутриентов широкого профиля.

Таблица 11. Динамика нарастания аминокислот в получаемом продукте

№ п/п	Наименование	№ образцов, %			Относительное изменение, % №3/№1
		№1	№2	№3	
1.	Аспарагиновая кислота	0,15	0,18	0,22	+46,67
2.	Треонин*	0,07	0,10	0,12	+71,42
3.	Серин	0,07	0,09	0,11	+57,14
4.	Глутаминовая кислота	0,32	0,23	0,25	-21,87
5.	Глицин	0,10	0,12	0,13	+30
6.	Аланин	0,12	0,13	0,15	+25
7.	Валин*	0,11	0,15	0,13	+18,18
8.	Изолейцин*	0,07	0,09	0,10	+42,85
9.	Лейцин*	0,12	0,17	0,16	+33,33
10.	Тирозин	0,06	0,08	0,10	+66,67
11.	Фенилаланин*	0,09	0,11	0,10	+11,11
12.	Гистидин	0,03	0,04	0,04	+33,33
13.	Лизин*	0,07	0,11	0,11	+57,14
14.	Аргинин*	0,07	0,09	0,09	+28,51

15.	Пролин	0,05	0,10	0,09	+80
16.	<b>Итого аминокислоты</b>	<b>1,47</b>	<b>1,77</b>	<b>1,90</b>	<b>+29,27</b>

№1: контроль - стерильный измельченный кукурузный стебель и свекольная пульпа, доведенные до 50%-ной влажности.

№2: Опыт №1 + засев культуры дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap, проинкубированный 48 ч при глубинно-твердофазном культивировании, t=30°C.

№3: Опыт №1 + засев культуры дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap и бактерий рода *Azotobacter chroococcum* Sp, проинкубированный 72 ч при t=30°C.

#### 2.2.4.4. Характеристика продукта, полученного путем биоконверсии

Характеристика получаемого продукта, условно названного дрожжевой стимулятором «micro soil» (микробный нутриент почвенного назначения), представлена в табл. 12.

Таблица 12. Характеристика продукта, полученного путем биоконверсии

Наименование показателя	Концентрат
Массовая доля СВ, % не менее	50
Микроорганизмы, КОЕ/г(см <sup>3</sup> ) не менее	
-Азотобактер	1·10 <sup>9</sup>
-Дрожжи	4·10 <sup>9</sup>

#### 2.2.4.5. Гранулометрический состав полученного продукта

Как известно из литературы, гранулометрический состав очень влияет на продуктивность растений. На рисунке 32 четко видно, что большинство частиц содержит размер менее 1мм. Частицы маленького диаметра имеют большую удельную поверхность, за счет этого обладают хорошей водоудерживающей способностью, что оказывает положительное влияние в засушливых условиях.

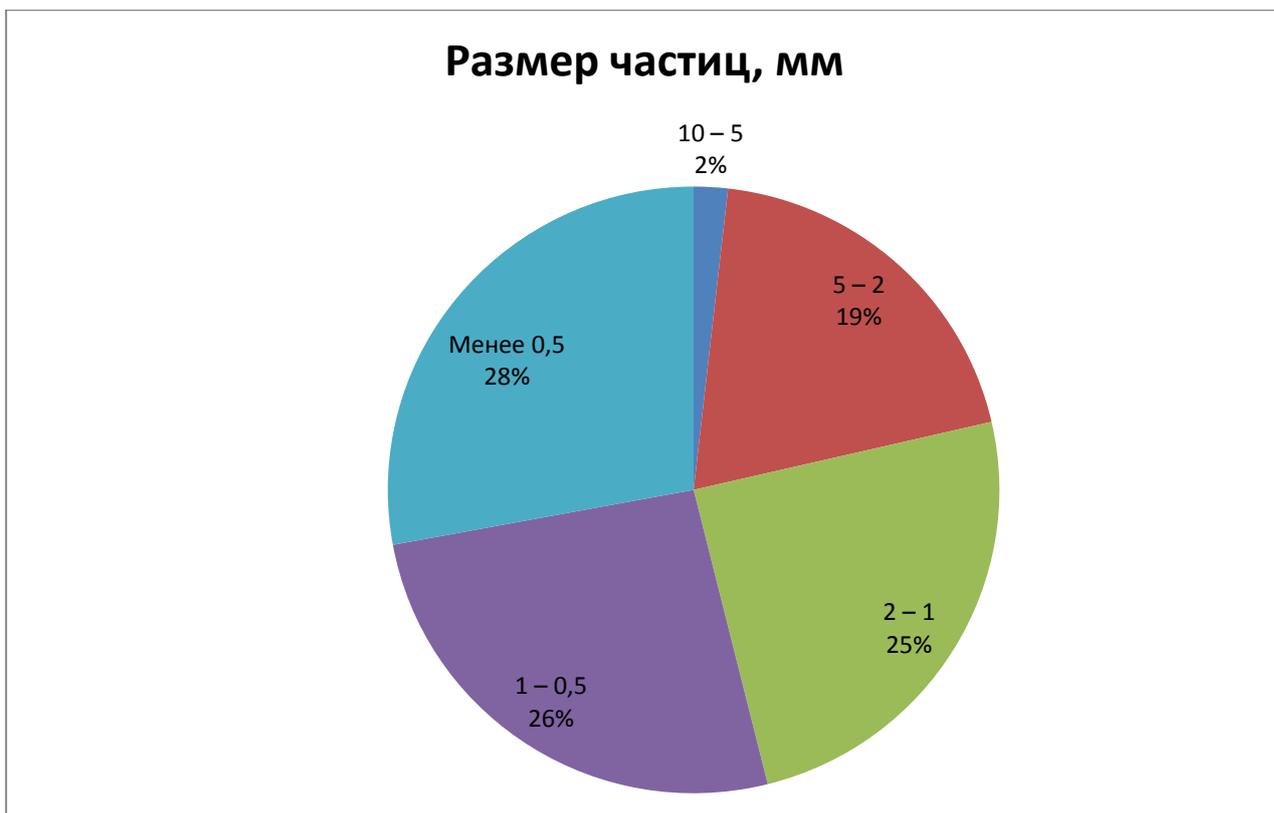


Рисунок 32. Гранулометрический состав

### 2.2.5. Испытание биологически активного продукта на развитии сельскохозяйственных культур

Вегетационный опыт проводили в лаборатории искусственного климата кафедры физиологии растений РГАУ-МСХА им. Тимирязева.

Полученный продукт вносили в сосуд объемом 1,5 дм<sup>3</sup>, где выращивали тест-растение. В помещении-фитотроне поддерживали температуру воздуха 20-26°C и относительную влажность 60-70%. Спектральный состав светового потока был приближен к естественному.



а.



в.



б.



г.



д.



е.

Рисунок 33. – (а,б,в,г,д,е) Помещение лаборатории искусственного климата

Тест-растение выращивали до определенной фазы вегетации. Продолжительность опыта – 21 сут. Повторность в опыте трехкратная. Контролем служила искусственная почва, то есть субстрат на основе верхового торфа (1кг/сосуд), в опытном варианте – смесь полученного продукта (0,4 кг) и искусственной почвы – субстрата на основе верхового торфа (0,6 кг), то есть в соотношении 2:3.

Влияние продукта оценивали после измерения биометрических показателей (измерение длины стебля, подсчет количества листьев, количества всходов).

Отмечается активный рост стеблей и повышение биомассы листьев в опытном варианте, что обеспечивает значительную экологическую устойчивость растений. При этом посевная партия тритикале отличалась высокой энергией прорастания. Однако контрольный вариант обладал несколько ослабленной энергией прорастания семян, несмотря на однородность партии семян в целом, в нашем эксперименте. Использование продукта для предпосевной обработки семян и внесение его в субстрат-почву кардинально влияет на увеличение показателей всхожести семян и развитие растений тритикале и салат, что в перспективе может повышать рентабельность производства. Управление биологическими свойствами тритикале и салата (повышение посевных качеств семян, активизация прикорневой микрофлоры (агронически ценной и т.п.) позволит повысить продуктивность растений.

Семена салата перед посевом проверяли на кондиционность: определяли массу, энергию прорастания, всхожесть.

Таблица 13. Измерение показателей прорастания семян салата

Вода проводная	Показатели			
	Число суточных проросток, шт	Энергия прорастания, %	Способность к прорастанию, %	Лабораторная всхожесть, %
	49,0	81,0	92,7	93,7

По посевным кондициям семена должны быть качественными и отвечать посевному стандарту с высокой энергией прорастания (табл. 13). В противном случае всходы будут изреженные и ослабленные. В нашем эксперименте были выровненные семена, дали дружные всходы и быстро сформировали ассимиляционную поверхность. В опытном варианте развитие салата сорта «Московский парниковый» проходило более энергично, чем в контроле: отмечались дружные всходы и более мощные ростки, с большим числом зародышевых корней и листьев (табл. 14).

Таблица 14. Влияние полученного продукта на рост и развитие салата сорта «Московский парниковый»

№ п/п	Вариант	Количество растений, шт./сосуд	Всхожесть семян, %	Длина листьев, см	Количество листьев, шт./сосуд
1	контроль	10	60	10±2	23±5
2	опыт	10	80	10±2	42±5

Аналогичная картина отмечалась и на растениях салата сорта «Гранд» и «Тайфун» (табл. 15 и 16). Эти показатели характеризуют более активный рост салатов, что обеспечивает лучшую устойчивость растений к неблагоприятным погодным условиям и к болезням.

Таблица 15. Влияние полученного продукта на рост и развитие салата сорта «Гранд»

№ п/п	Вариант	Количество растений, шт./сосуд	Всхожесть семян, %	Длина листьев, см	Количество листьев, шт./сосуд
1	контроль	10	60	9±2	25±5
2	опыт	10	70	10±2	41±5

Таблица 16. Влияние полученного продукта на рост и развитие салата сорта «Тайфун»

№ п/п	Вариант	Количество растений, шт./сосуд	Всхожесть семян, %	Длина листьев, см	Количество листьев, шт./сосуд
1	контроль	10	50	8±2	21±5
2	опыт	10	90	10±2	39±5

Биологические особенности салата предрасполагают (благоприятны) поражению многими видами патогенов, особенно ослаблению растений, имеющих слаборазвитую корневую систему и дефекты роста зародыша. Полученный продукт в опытных вариантах способствует усилению роста зародыша салата, активной прорастаемости и обильному росту корней, что способствует повышению ассимиляционной поверхности салата и его физиологической продуктивности.

Семена злаковых культур (тритикале сорт «Немчиновский 56») оказались высокочувствительными к внесению продукта (табл. 17). По-видимому, повышаемая активность продукта влияла не только на посевные качества семян, но и активность ризосферных микроорганизмов (табл. 18, 19), и субстратов для поддержания жизнеспособности клеток полученного продукта.

Таблица 17. Влияние полученного продукта на рост и развитие тритикале сорта «Немчиновский 56»

№ п/п	Вариант	Количество растений, шт./сосуд	Всхожесть семян, %	Длина стеблей, см	Количество листьев, шт./сосуд
1	контроль	15	80	23±2	19±5
2	опыт	15	100	40±2	30±5

Таблица 18. Влияние полученного продукта на рост и развитие тритикале сорта «Антей»

№ п/п	вариант	Количество растений, шт./сосуд	Всхожесть семян, %	Длина стеблей, см	Количество листьев, шт./сосуд
1	контроль	15	60	20±2	22±5
2	опыт	15	93	40±2	30±5

Таблица 19. Влияние полученного продукта на рост и развитие тритикале сорта «Гермес»

№ п/п	Вариант	Количество растений, шт./сосуд	Всхожесть семян, %	Длина стеблей, см	Количество листьев, шт./сосуд
1	контроль	15	73	25±2	21±5
2	опыт	15	93	41±2	33±5

Успех использования бактериально-дрожжевого стимулятора зависит от приживаемости азотобактера и дрожжей в зоне корня и на самих корнях (ризоплане и ризосфере). В нашем эксперименте отмечается положительный ризосферный эффект, конкурентные преимущества по отношению к аборигенным микроорганизмам и повышение продуктивности растительного организма.

Реализация экспериментальных данных позволит шире рассмотреть подходы к интродукции азотобактера и дрожжей в качестве удобрительного средства под сельскохозяйственные культуры и позволит глубже изучить механизмы адаптации и гомеостаза почвенных микроорганизмов. В свою очередь будет решена проблема оптимизации питания растения, повышения урожайности сельскохозяйственных культур и безопасности зерновой и овощной продукции.

Внедрение предлагаемого приёма в сельскохозяйственное производство повысит урожайность на 18 – 25% и качество продукции, снизит дозы внесения

минеральных удобрений и пестицидов и сохранит микробное разнообразие почв полей и грунтов теплиц.

Затраты на внедрение в производство предлагаемой биотехнологии окупятся в течение 1-2 лет благодаря низкой себестоимости производства дрожжевого стимулятора роста растений, получения экологически безопасной сельскохозяйственной продукции, повышения продуктивности растений и экологичности технологии возделывания сельскохозяйственных культур на любых типах почв. Одновременно снижается инфекционный фон, а почвы и грунты теплиц обогащаются биологически активными соединениями, способными подавлять развитие почвенных фитопатогенов.

### **Испытание полученного продукта в Рязанской области**

В домашних условиях в частной теплице был использован продукт в качестве обогатителя почвы, то есть контроль выращивался в ящике с почвой (100%), а опыт – в ящике с почвой и продуктом в соотношении 3:1.



а.



б.

Рисунок 34 (а,б). Влияние полученного продукта на растения кориандр сорта «Янтарь»

На рисунке 34 был показан самый наглядный пример роста растения кориандр сорта «Янтарь»

В ходе эксперимента было установлено, что полученный продукт активно влияет на рост и развитие растения кориандр сорта «Янтарь» (табл.20). Было выявлено повышение всхожести семян, которая обеспечивает их выживание.

Известно, что характер и интенсивность физиологических процессов, протекающих в семени, зависит от активности ферментного комплекса и качества семян, что в свою очередь влияет на эпифитную микрофлору и устойчивость растения к фитопатогенам. Эпифитная микрофлора здорового семени-растения, как правило, представлена агрономически здоровыми микроорганизмами.

Таблица 20. Влияние полученного продукта на рост и развитие растения кориандр сорта «Янтарь»

№ п/п	Вариант	Количество растений, шт./сосуд	Всхожесть семян, %	Длина стеблей, см
1	контроль	60	90	16±2
2	опыт	60	100	18±2

Полученный нами продукт улучшает не только качество семян и режим питания проростка, он в определённой степени компенсирует недостаток минерального питания. Однако динамика развития бактериально-дрожжевого стимулятора зависит от условий интродукции, природы штаммов, состояния грунта посева семян, а также конкурентной способности естественных популяций микроорганизмов. Поэтому необходим подбор интродуцентов, эффективно конкурирующих с природными почвенными микроорганизмами, так же специальных приемов.

#### **2.2.6. Физико-химические показатели продукта, полученного из дрожже-бактериальной ассоциации**

Анализ элементного состава показал, что в продукте больше содержится фосфора по сравнению с кальцием, калием, магнием и железом (табл.21). Это представляется наиболее интересным, поскольку из литературы известно, что фосфор играет особую роль в питания растений, то есть выполняет энергетическую и конституционную функцию растений и других организмов. Здесь представлен также и кальций, который влияет на обмен углеводов и белковых веществ в растениях.

Таблица 21. Элементный состав продукта

№п/п	Элементы	Содержание, %
1	Фосфор	0,30
2	Кальций	0,20
3	Калий	0,014
4	Магний	0,05

5	Железо	0,024
---	--------	-------

Процент клетчатки, представленный в таблице 22, объясняется тем, что полученный нами продукт был сформулирован в основном из целлюлозосодержащего субстрата, то есть из кукурузного стебля.

Таблица 22. Процентное содержание золы, жира и клетчатки в продукте

Наименование	Содержание, %
Зола	2,3
Жир	0,27
Клетчатка	6,2

Таблица 23. Физико-химические и биологические показатели продукта на основе дрожже-бактериальной ассоциации

№ п/п	Название элемента	Содержание, %
1	Массовая доля сырого протеина, %	35,8
2	Аспарагиновая кислота	0,22
3	Треонин	0,12
4	Серин	0,11
5	Глутаминовая кислота	0,25
6	Глицин	0,13
7	Аланин	0,15
8	Валин*	0,13
9	Изолейцин*	0,10
10	Лейцин*	0,16
11	Тирозин	0,10
12	Фенилаланин*	0,10
13	Гистидин	0,04
14	Лизин*	0,11
15	Аргинин*	0,09
16	Пролин	0,09
17	Зола	2,3
18	Жир	0,27
19	Клетчатка	6,2
20	Глюкоза	0,078
21	Мальтоза	0,141
22	Фосфор	0,30

23	Кальций	0,20
24	Калий	0,014
25	Магний	0,05
26	Железо	0,024

### 3. Выводы:

1. Дрожжи рода *Pichia* – суперпродуценты биомассы на твердых растительных субстратах могут быть выделены из различных биологических субстратов животного и растительного происхождения, причем из растительных субстратов суперпродуценты выделяются с большей частотой.

2. Рост отобранных дрожжей-продуцентов возможен как на целлюлозосодержащих субстратах, так и на их комплексах с углеводистыми субстратами, очень интенсивно стимулирующими рост дрожжей.

3. Негативное влияние посторонней микрофлоры на процесс твердофазного культивирования дрожжей может быть преодолено путем глубинного культивирования дрожжей на стерильных жидких гетерогенных средах и засева/увлажнения жидкими, высокоактивными культурами различных твердых растительных материалов.

4. Стимулирующее действие твердофазных дрожжевых и бактериальных культур на рост растений может быть объяснено как модификацией химического состава твердого растительного субстрата в ходе дрожжевой биоконверсии, так и активным размножением полезных почвенных бактерий в ростовых субстратах, содержащих дрожжевые культуры.

5. Реализация процесса производства дрожже-растительных нутриентов почвенного назначения может создать предпосылку для последующего производства подобных продуктов как кормового, так и пищевого профиля.

6. Разработан лабораторный регламент производства дрожже-растительного нутриента широкого профиля и ТУ 20.15.80-001-02068634-2017 нового продукта, которые могут быть адаптированы как к вновь создаваемым

биотехнологическим производствам, так и к некоторым остановленным в настоящее время предприятиям пищевой промышленности.

7. Комплексная твердофазная культура *Pichia guilliermondii* Ap и *Azotobacter chroococcum* Sp на измельченных кукурузных стеблях с углеводистыми добавками обладает стимулирующим эффектом на рост ряда сельскохозяйственных культур.

#### **4. Технологическая часть**

##### **Стадия ВР 1. Подготовка сырья.**

Прием и хранение сырья осуществляется на складе при температуре 20-25°C. Каждая партия поступившего со склада сырья подается в измельчитель (дробилку), где происходит измельчение. Измельченный кукурузный стебель по необходимости взвешивается на весах по 30 кг и транспортируется в стерилизатор-смеситель (хлебопекарную печь) с помощью шнека.

##### **Стадия ВР 2. Подготовка оборудования к работе.**

Перед началом процесса производства и после его завершения систему аппаратов промывают водой и 2-3% раствором каустической соды, а затем стерилизуют.

##### **Стадия ВР 3. Подготовка воздуха для аэрирования.**

Воздух для аэрирования поступает из атмосферы, предварительно пройдя многоступенчатую систему очистки, заканчивающуюся индивидуальным фильтром.

##### **Стадия ВР 4. Подготовка питательной среды.**

Измельченный кукурузный стебель прожаривают в хлебопекарной печи в течение 30 минут при температуре 120-140°C или стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C 40 минут и подсушивают.

##### **Стадия ТП 5. Получение посевного материала в лаборатории.**

Все работы по получению посевного материала осуществляют с соблюдением правил асептики: стерилизация посуды и оборудования, с помощью которого проводятся манипуляции с культурой дрожжей, обеспложивание жидких и плотных питательных сред, на которых выращивается посевной материал. Посевной материал дрожже-бактериальной ассоциации готовят на стерильной измельченной столовой свекле, разбавленной водой в качалочных колбах в соотношении 1:2, засевая на нее чистую культуру дрожжей *Pichia guilliermondii* Ap и бактерий *azotobacter*

*chroococcum* sp, ферментируют 48 часа при температуре 28-32°C по методу глубинной ферментации.

**Стадия ТП 6. Засев питательной среды в смесителе.** Стерильный субстрат (кукурузный стебель) увлажняют до 50% посевным материалом (ферментированная столовая свекла из расчета достижения не менее  $1 \cdot 10^9$  дрожжевых клеток и  $1 \cdot 10^8$  бактерий на грамм субстрата).

**Стадия ТП 7. Аэробное твердофазное культивирование в растительной установке.** Полученную смесь хорошо перемешивают и укладывают на поддоны из пищевой нержавеющей стали или другого материала, допускающего контакт с пищевыми продуктами, слоем не толще 4 сантиметра и ставят в растительную камеру где поддерживается температура 30°C и ферментируют 72 часа до накопления максимального количества дрожжевых клеток на субстрате, что определяют путем их подсчета в камере Горяева.

#### **Стадия ТП 8. Сушка.**

Сушку осуществляют в щадящем режиме при температуре 40-45 °C до конечной влажности 50%.

#### **Стадия УМО 9. Упаковка, маркировка, отгрузка.**

Полученный продукт расфасовывают по 10кг, упаковывают в тканевые мешки с пленочным вкладышем по ГОСТ 19360-74 или полиэтиленовые мешки по ГОСТ 17811-11. Остальные требования к упаковке – по ГОСТ 51850-2001.

На каждой упаковочной единице (мешке) типографским способом, в виде этикетки, штемпелевание или другим способом должно быть указано:

- наименование продукции;
- масса нетто (кг);
- номер партии;
- товарный знак изготовителя (при наличии);
- условия хранения;
- дата изготовления и упаковывания (число, месяц, год);
- срок годности;
- обозначение настоящих технических условий.

### **Очистка газоздушных выбросов.**

Основными мерами предотвращения загрязнения атмосферы является герметизация растительных камер, а также очистка отходящего воздуха.

### **Очистка сточных вод.**

Целью очистки производственных сточных вод является удаление из них взвешенных и растворимых веществ до предельно допустимых концентраций, значения которых заранее регламентируются.

Для этого используют схему очистки, заключающуюся в механическом отделении загрязнений (процеживания и отстаивания) и задержании крупных примесей на механизированных решетках, измельчении на дробилках, смешивании с общим потоком сточных вод и отделении зернистых минеральных загрязнений в песколовушках.

### **Удаление конденсата в канализацию.**

В производственных процессах промышленные стоки делятся на условно чистые и загрязненные. К условно чистым относятся воды, в которых не происходит изменение химического состава, а только температуры. Загрязненные характеризуются присутствием органических и неорганических веществ. Условно чистые воды после охлаждения, могут сбрасываться непосредственно в канализацию. Загрязненные воды должны пройти предварительную очистку.

## Блок-схема технологического процесса

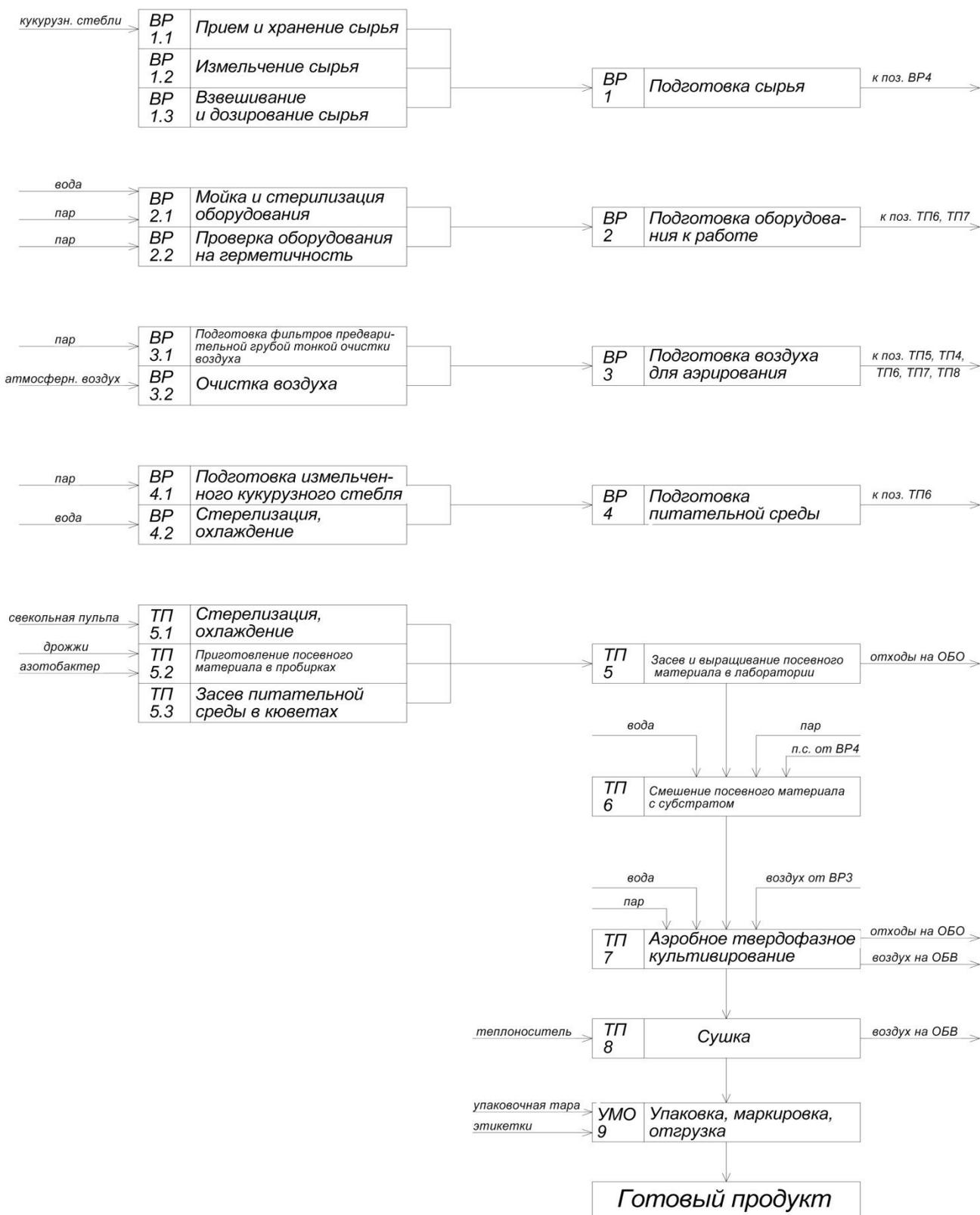


Рисунок 35. Блок-схема технологического процесса получения дрожже-бактериального стимулятора роста растений на базе кукурузного стебля и столовой свеклы



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абакумова Н.А., Быкова Н.Н. 9. Углеводы // Органическая химия и основы биохимии. Часть 1. — Тамбов: ГОУ ВПО ТГТУ, 2010. — ISBN 978-5-8265-0922-7
2. Аверьянова Е.В., Митрофанов Р.Ю. Пектин. Получение и свойства — Бийск: Изд-во Алт. гос. тех. ун-та, 2006. - 44 с.
3. Аппель Б., Бенеке И., Бенсон Я., под ред. С. Мюллер. Нуклеиновые кислоты от А до Я. — М.: Бином, 2012. — 352 с.
4. Бабицкая В.Г., Стахеева И.А., Плавская А.И. Мицелиальные грибы — продукты белка на целлюлозе. // Микробиология и фитопатология. — 1979. — Т. 13. — №2. — с. 118 - 122.
5. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. — М.: Московский университет, 1992. — 128 с.
6. Бекер М.Е. Микробная биоконверсия растительного сырья и перспективы ее использования // Вестник АН СССР, 1983. — №6. — с. 89-98.
7. Билич Г. Л., Крыжановский В. А. Биология. Полный курс: В 4 т. — издание 5-е, дополненное и переработанное. — Оникс, 2009. — С. 20. — 864 с.
8. Бойко З.М., Романчук А.Г. Использование отходов свинооткормочного комплекса. Копрологические аспекты промышленного животноводства, тезисы докл. сов. чехосл. — симп. Ужгород, 1985. — с. 102-104.
9. Бондаренко В.М., Грачева Н.М. Пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов // Фарматека. - 2003. - № 7. — с. 56-63.
10. Борисенко Е.Г., Горин К.В. и др. Исследование оптимальных условий культивирования перспективных штаммов дрожжей — источников биологически активных веществ на основе растительного сырья и отходов его переработки. // Производство спирта и ликероводочных изделий, 2012, № 1, с.18.

11. Борисенко Н.А. Разработка технологии ферментированных продуктов на основе зерна ржи. Дисс... канд. тех. наук. – М.: 1996. – 200 с.
12. Борисов А.Ю., Розов С.М., Цыганов В.Е., Куликова О.А., Колычева А.Н., Якоби Л.М., Овцына А.О., Тихонович И.А. Выявление симбиотических генов гороха (*Pisum sativum* L.) с использованием экспериментального мутагенеза // Генетика. – 1994. – Т.30.- №11. – С.1484 – 1494.
13. Бутова С.Н. Биотехнологическая деградация отходов растительного сырья. – М.: Россельхозакадемия, 2004. -320 с.
14. Васильев Д.А., Щербаков А.А., Караунина Л.В., Золотухин С.Н., Швиденка И.Г. Методы общей бактериологии. – Ульяновск, 2003. – 133 с.
15. Вербина Н.М., Каптерева Ю.В. Микробиология пищевых производств. – М.: Агропромиздат, 1988. – 256с.
16. Виестур У.Э. и др. Система ферментации. Рига. Зинатне, 1986. – 174 с.
17. Винаров А.Ю., Цыганкова Н.И., Гордеева Е.И., Захарычев А.П. Процессы предобработки сырья и глубинное культивирование микроорганизмов // Хранение и переработка сельхозсырья, 2004. – N.5. – с. 20-22.
18. Войно Л.И. Методические указания к выполнению лабораторных работ по разделу «Дрожжи» курса «Микробиология». – М.: МГУПП, 1999. – 19 с.
19. Волков Н.И., Несен Э.Н. Биохимические основы жизнедеятельности организма человека. – М: Мир, 2000. – 503 с.
20. Воробьева Г.И., Выслоух В.А., Тихонов И.Д., Картуш Р.В. Обогащение крахмал- и целлюлозосодержащего сырья белком микроорганизмов // Биоконверсия растительного сырья: тез. докл. – Рига: Зинатне, 1982.- с. 186.
21. Воробьева Л.И. Наипольнейшие из анаэробов. Пропионовокислые бактерии для биотехнологии.// Химия и жизнь. – 1984. - №5. – с. 19 - 22.
22. Гивартовский Р.В. Пищевые дрожжи и их приенение. – М.: Госторгиздат, 1930. – 22 с.

23. Горбунова С.Ю., Лукьянов В.А. // Экспериментальная оценка влияния *Chlorella vulgaris* на рост и развитие ячменя/ С.Ю. Горбунова, В.А. Лукьянов // «Pontus Euxinus 2013»-2013, с.37.
24. Горин К.В. Разработка технологии микробных нутриентов-биокорректоров на базе целлюлозосодержащего сырья: дис... кан. тех. наук. МГУПП. – М., 2011. 160 С.
25. Градова Н.Б. Использование непрерывного процесса культивирования для получения микробной биомассы. В кн.: Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов. – М.: Наука, 1980. – с. 91-98.
26. Грачева И.М., Гаврилова Н.Н., Иванова Л.А. Технология микробиологических белковых препаратов, аминокислот и жиров. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 436 с.
27. Грачева И.М., Иванова Л.А., Кантере В.М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия. – М.: Колос, 1992. – 383 с.
28. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов – 3-е изд., перераб. И под. М.: Изд-во «Элевар», 200. – 512 с.
29. Грачева Ю.П. Математические методы планирования экспериментов. – М.: Пищевая промышленность, 1971. – 198 с.
30. Гребинский С.О. Биохимия растений. Изд-во Львовского университета, 1967. 263 с.
31. Демидов А.П. Влияние биогенных стимуляторов роста и химических средств защиты растений на урожайность и качество яровой пшеницы в степной зоне Оренбургского Предуралья: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Оренб., 2001. – 25с.
32. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. М.: Наука, 2002.- 282с.
33. Домарецкий В.А. Производство концентратов экстрактов и безалкогольных напитков. Справочник. – Киев: Урожай, 1990. – 244 с.

34. Жмакин А.И., Шейбак В.М., Островною С.А. Общая микробиология: пособие для студентов лечебного и педиатрического факультетов. – Гродно: УО «ГрГМУ», 2008. – 96с.
35. Жолик Г.А., Козлов Н.А. Технология переработки растительного сырья. Часть 2 – Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2004. – 140 с.
36. Жолик Г.А., Козлов Н.А. Технология переработки растительного сырья. Часть 1 – Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, 2004. – 204 с.
37. Завалин А.А., Соколенко В.А., Соколов В.А., Благовещенская Г.Г., Кожемяков А.П. Использование удобрений и арбускулярной микоризы при возделывании вики посевной // Плодородие. – 2007. - № 4. – С. 24-26.
38. Иванова Л.А., Войно Л.И., Борисенко Е.Г., Иванова И.С. Методические рекомендации к проведению лабораторных работ. – МГУПП, 2002. – 67с.
39. Иванова Л.А., Войно Л.И. – Пищевая биотехнология. – М.: КолосС, 2008. – 472 с.
40. Иванова Л.А., Войно Л.И., Строева С.С. Лабораторный практикум по общей биотехнологии. – М.: МГУПП, 2009. – 148 с.
41. Каратыгин И.В., Снигиревская Н.С., Демченко К.Н. Эндомикориза растений в экосистемах раннего девона // Микология и фитопатология. - 2006.- Т.40.- №6. – с.494.
42. Кидин В.В., Торшин С.П. Агрохимия. Учебник. — Проспект, 2015. — 619 с.
43. Кислухина О.В. Витаминные комплексы из растительного сырья. – М.: ДеЛи принт. 2004. – 308 с.
44. Кислухина О.В., Кюдулак И.И. Биотехнологические основы переработки растительного сырья. – Кунас: Технология, 1997. – 183 с.
45. Красноштанова А.А., Крылов И.А., Бабусенко Е.Г. Основы биотехнологии. – М., 2001. – 84 с.

46. Кретович В.Л. Биохимия растений. – 2 изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1986. – 503 с.
47. Кретович В.Л. Основы биохимии растений. – М.: Высшая школа, 1971. – 464 с.
48. Ле Ван Ньонг. Микробиологические и биохимические основы технологии вьетнамских традиционных ферментированных пищевых продуктов: дисс... д-ра. тех. наук. МТИПП. – М., 1981. – 366с.
49. Лобанов П.П. и др.. Сельскохозяйственная энциклопедия. т. 1 (А-Е)/ Ред. коллегия: Издание третье, переработанное. – М.: Государственное издательство сельскохозяйственной литературы, 1949. – 620с.
50. Лукьянов В.А. // агроэкологическая оценка применения одноклеточных фотосинтезирующих организмов на темно-серых лесных почвах центрального Черноземья, Москва2015, с.
51. Марагашвили Г.Р., Эпистов Э.М.. Повышение питательной ценности отходов виноделия с помощью ускорителей электронов. 1-ый Всесоюзный радиобиологический съезд: тезис. докл. – Пущино, 1989. – т.3. – с. 789-790.
52. Маргелис Л. роль симбиоза в эволюции клетки. М.: Мир, 1983. – 354с
53. Матевосян Г.Л., Кудашов А.А., Езаов А.Е. Влияние фиторегуляторов и биопрепаратов на рост, развитие, урожайность и устойчивость томата к вирусной инфекции // Агрехимия.- 2001.- №3.- С. 51-56.
54. Микеладзе Г.Г., Кишелашвили. Биотрансформация вторичного сырья виноделия путем симбиоза различных микроорганизмов. Биотрансформация вторичного растительного сырья в белковые кормовые продукты. // Тез. докл. респ. конф. Тбилиси, 1987. – с. 57.
55. Миронов П.В., Величко Н.А., Ерменко О.Н., Громовых Т.И., Репях С.М. Технология биоконверсии растительного сырья: Ч.2. Перспективные

- технологии микробиологической конверсии растительной биомассы. – Красноярск: СибГТУ, 2002. 150 с.
56. Назарова Н. И. Общая биотехнология пищевых производств.. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 360 с.
57. Нгуен Ким Зунг. Разработка технологии получения дрожжевых лечебно – профилактических препаратов на твердых растительных субстратах: дисс... кан. тех. Наук. МГАПП. – М., 1996 – 151 с.
58. Нгуен Чыонг Занг. Разработка технологии продуктов питания на базе микробной биоконверсии комплексного растительного сырья: дисс. канд. тех. наук. – М., 2012. 193 С.
59. Неверова О.А., Асташев А.В., Давыденко Н.И. Исследование влияния сульфата железа на накопление биомассы хлебопекарными дрожжами на стадии маточных культур – Ползуновский вестник №3/2, 2011. с. 150-154.
60. Неверова О.А., Гореликова Г.А., Позняковский В.М. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007. – 415 с.
61. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений – под ред. Нетрусов А.И. – М.: Издательский центр «Академия», 2005 – 608 с.
62. Нечаев А.П., Траубенберг С.Е., Кочеткова А.А. и др. Пищевая химия// Под ред. А.П. Нечаева. – 5-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2012. – 672 с.
63. Нетрусов А.И. и др. Экология микроорганизмов // под ред. Нетрусова А.И. – М.: Изд. центр «Академия», 2004. - 272 с.
64. Новиков Ю.Ф. и др. Выращивание микробов методом твердофазной ферментации. Биотехнология. – М., 1985. – N.4. – С. 12-27.
65. Овчаров К.Е. Витамины растений. – М.: Колос, 1969. – 238 с.
66. Панфилов В.И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения: дисс. док. тех. наук. – М., 2004. – 371с.

67. Парфенов А.И. Профилактика и лечение запоров пробиотиками// Фарматека. – 2006. - №12. – с. 23-24.
68. Плешков Б.П. Биохимия сельскохозяйственных растений. – М.: Колос, 1975. – 496 с.
69. Полянская Л.М., Ведица О.В., Лысак Л.В., Звягинцев Д.Г. Стимуляция роста растений культурами *Weijerinckia* и *Clostridium* // Микробиология 2002. –Т. 71.- №1. –С. 123-129.
70. Польшалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник //Москва ДеЛи принт 2003. – с. 152-154.
71. Проворов Н.А., Воробьев Н.И., Андронов Е.Е. Макро- и микроэволюция бактерий и в системах симбиоза // Генетика, 2008; Т.44, №1. 12-28.С.
72. Проворов Н.А. Происхождение и эволюция бобово-ризобияльного симбиоза // Общая биология 2001.- Т.62.- С.472-495.
73. Рогов. И.А., Антипова Л.В., Дунченко Н.И. Химия пищи. – М.: КолосС, 2007. – 853 с.
74. Роговин З.А. Химия целлюлозы. М., 1972. – 519 с.
75. Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Янина М.М., Гилязетдинов Ш.Я. Эмистим – индуктор устойчивости к вирусным болезням пасленовых // Аграрная Россия. Научно-производственный бюллетень.- 1999. –N.1 – с. 35-39.
76. Рубин Б.А., Арциховская Е.В., Аксенова В.А. Биохимия и физиология иммунитета растений. – М.: Высш. школа, 1975. – 320 с.
77. Рубин Б.А. Проблемы физиологии в современном растениеводстве. – М.: Колос, 1979. – 302 с.
78. Саловарова В.П., Козлов Ю.П. Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов. – М.: Энергия, 2007 – 544 с.
79. Сидоренко О.Д., Борисенко Е.Г., Ванькова А.А., Войно Л.И. Микробиология: учебник для агротехнологов. – М.: ИНФРА, 2009. – 287 с.

80. Сидоренко О.Д. // Интродукция бактериальных ассоциаций защитного и стимулирующего действия в ризоценоз бобового растения. Тез. докл. VII Конгресса по защите растений. г. Златибор, Сербия. 2014, с. 81-83.
81. Сеницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигно-целлюлозных материалов. М.: МГУ, 1995.- 224 с.
82. Синчурина Е.В. Разработка биотехнологии препарата регулятора роста сельскохозяйственных растений на основе синтеза биологически активных веществ микромицетом *Phialocephala fortinii*: дисс. канд. тех. наук. – М., 2011. С.80-81.
83. Скурихин И.М. Химический состав пищевых продуктов. Кн.2. Справочник. – М.: Агропромиздат, 1987. – 360 с.
84. Скурихин И.М. Химический состав российских пищевых продуктов. Под ред. проф. И.М. Скурухина и проф. В.А. Тутельяна. – М.: ДеЛи принт, 2002. – 236 с.
85. Сорокин А. В., Ким Е. Р., Овчинников Л. П. Протеасомная система деградации и процессинга белков // Успехи биологической химии. — 2009. — Т. 49. — С. 3—76.
86. Стахеев И.В. Культивирование дрожжей и грибов-продуцентов протеина на отходах переработки картофеля. – Минск: Наука и техника, 1978. – 81 с.
87. Сушкова В.И., Воробьева Г.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества. – М.: ДеЛи принт, 2008. – 216 с.
88. Тарасенко С.А., Дорошкевич Е.И., Тарасенко В.С. Влияние стимуляторов роста на урожай и качество сельскохозяйственных культур// Тез. докл. шестой международной конференции «Регуляторы роста и развития растений», г.2001.- 280с.
89. Тимейко Л.В., Будыкина Н.П., Дроздов С.Н. Влияние физиологически активных веществ на рост, развитие и формирование фотосинтетического аппарата растений огурца: Тезисы док. шестой международной

- конференции «Регуляторы роста и развития растений», г.2001.- с. 281-282.
90. Тихонович И.А., Круглов Ю.В., Кожемяков А.П., Пароменская Л.Н., Белмов А.А., Борисов А.Ю. Микробиологические аспекты восстановления техногенно загрязненных почв и повышения качества сельскохозяйственной продукции // Достижения науки и техники АПК.- 2002. N. 10.- С. 8-11.
91. Удалова Э.В., Родионова Н.А., Феодоритова Е.Л. и др. Энзиматическая конверсия растительного сырья и отходов сельскохозяйственного производства. Производство и применение продуктов микробиологических производств: обзор. / ВНИИСЭНТИ. – М., 1990. – Вып. 8. – 33 с.
92. Ушанова В.М., Лебедева О.И., Девятловская А.Н. Основы научных исследований Ч.3: Исследование химического состава растительного сырья. – Красноярск: Сиб ГТУ, 2004. – 382 с.
93. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. – М.: Агар, 1999. – 512 с.
94. Филиппова Г.Г. Смолич И.И. Основы биохимии растений: курс лекций. – Минск: БГУ, 2004. – 136 с.
95. Фицев А.И. Проблемы и перспективы производства кормового белка в России // Кормопроизводство, 2003. - №10. – с. 25-31.
96. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств. – М.: Лесн. промышленность, 1989. – 496 с.
97. Хрычева А.И., Исследование влияния микроэлементов на биосинтетическую активность и хлебопекарные свойства дрожжей: Автореф. дис. канд. тех. наук. – М.: ВНИИПБ, 1977. – 24 с.
98. Чан Ван Ти. Разработка технологии дрожже – бактериальных функциональных продуктов на базе зернового сырья: дисс. канд. тех. наук. – М., 2013. 210 С.
99. Шевченко А.И., Турченко Л.А., Шевченко М.А. Качество зерна яровой пшеницы при до посевном применении биологически активных веществ:

- Тезисы док. шестой международной конференции «Регуляторы роста и развития растений», г.2001.- с. 296.
100. Шлегель Г.Г. История микробиологии: Пер. с нем. –М.: УРСС, 2002.- 304с.
  101. Шлегель Г. Общая микробиология. Пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
  102. Шрёдингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики? пер. с англ. А.А. Малиновского. — Москва: РИМИС, 2009. — С. 176.
  103. Щербаков В.Г., Лобанок В.Г. Биохимия и товароведение масличного сырья. – М.: КолосС, 2003. – 360 с.
  104. Щербаков В.Г., Лобанок В.Г., Прудникова Т.Н., Минакова А.Д. Биохимия/ Под ред. В.Г., Щербакова. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с.
  105. Щербаков В.Г., Лобанок В.Г., Прудникова Т.Н., Федорова С.А. Биохимия растительного сырья/ Под. ред. В.Г. Щербакова. – М.: Колос, 1999. – 376 с.
  106. Янкелевич Р.К., ., Басинская Е.А. Влияние регуляторов роста растений на продуктивность растений кукурузы // Тезисы док. шестой международной конференции «Регуляторы роста и развития растений», г.2001.- с. 298- 299.
  107. Янчевская Т.Г., Ольшаникова А.Л., Вербицка Н.А. Действие на растения картофеля биологически активных веществ природного происхождения: Тезисы док. шестой международной конференции «Регуляторы роста и развития растений», г.2001.- с. 299.
  108. Яровенко В.Л. и др. Технология спирта. – М.: Колос, Колос-Пресс, 2002. - 464 с.
  109. Alberti S. Molecular mechanisms of spatial protein quality control // Prion. — 2012. — Т. 6, вып. 5. — С. 437—442.
  110. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. — 5th. ISBN 978-0-8153-4105-5— Garland Science, 2007.

111. Antonia Heredia, Ana Jimenez, Rafael Guillen. Composition of plant cell walls// Z. Lebensm. Unters. Forsch. – 1995. – N.200. – P. 24-31.
112. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Molecular Biology of the Cell. — 5. — Garland Science, 2008. — 1392 c.
113. Budowle B, van Daal A (April 2009). "Extracting evidence from forensic DNA analyses: future molecular biology directions". BioTechniques. 46 (5): 339–40, 342–50.
114. Cairney J.W.G. Evolution of mycorrhiza systema // Naturwissenschaften. 2000. Bd. 87.H. 11. S. 467-475.
115. Carroll and Salt, Steven B. and Steven D. (2004). Ecology for Gardeners. Cambridge: Timber Press. ISBN 9780881926118.
116. Cox, Michael; Nelson, David (2008). Principles of Biochemistry. Susan Winslow. p. 288.
117. Demartino G. N., Gillette T. G. Proteasomes: machines for all reasons // Cell. — 2007. — T. 129, вып. 4. — С. 659—662.
118. Dobereiner J. C., Thomson B.D. The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi // Plant and Soil.- 1994.- Vol. 159. –P.- 158.
119. Dobson C. M. The nature and significance of protein folding // Mechanisms of Protein Folding / Pain R. H.. — 2nd. — New York, NY: Oxford University Press, 2000.
120. Dolores R. Piperno. Assessing elements of an extended evolutionary synthesis for plant domestication and agricultural origin research, PNAS 2017 114 (25) 6429-6437; published ahead of print June 2, 2017.
121. Douglas A.E. Symbiotic interaction. Oxford Univers. Press: Oxford: Y-N, Toronto, 1994. P.-148.
122. Du, Z.; Denkenberger, D.; Pearce, J.M. (2015). "Solar photovoltaic powered on-site ammonia production for nitrogen fertilization". Solar Energy. 122: 562–568.

123. Erickson H. P. Evolution of the cytoskeleton // *Bioessays*. — 2007. — Т. 29, вып. 7. — С. 668—677.
124. FAO (2012). Current world fertilizer trends and outlook to 2016 (PDF). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. p. 13. Retrieved 3 July 2014. (10/09/2017)
125. [http://biochemistry.ru/biohimija\\_severina/B5873Part44-298.html](http://biochemistry.ru/biohimija_severina/B5873Part44-298.html) (20/01/2017)
126. [http://edufuture.biz/index.php?title=Селекция\\_микроорганизмов](http://edufuture.biz/index.php?title=Селекция_микроорганизмов) (03/02/2017)
127. <http://mikrobiki.ru/mikrobiologiya/mikrobiologiya-i-biotehnologii/osnovnaya-fermentatsiya.html> (10/01/2017)
128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17563102?dopt=Abstract> (15/06/2017)
129. <http://www.spsl.nsc.ru/FullText/konfe/strategiya-2010%5B1%5D.pdf> (09/04/2017)
130. JONDREVILLE C., DOURMAD J.-Y., 2005. Le phosphore dans la nutrition des porcs. *INRA Prod. Anim.*, 18, 183-192.
131. Marie-claire Frederic, *Ni cru ni cuit. Histoire et civilisation de l'aliment fermenté*, Alma Editeur, 2014, 360 p.
132. Maybelline Escalante-Ten Hoopen et Abdou Maïga, *Production et transformation du maïs*, Wageningen, Pays-Bas, ISF Cameroun et CTA, coll. « PRO-AGRO », 2012, 32 p.
133. Mohammad A., Khan A.G., Kuek C. Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi // *Mycorrhiza*. — 2000. — N.9- P.337-339.
134. Mortvedt, JJ; Beaton, JD. "Heavy Metal And Radionuclide Contaminants In Phosphate Fertilizers". Archived from the original on 26 July 2014.
135. Napier R.M., Venis M.A. Receptors for plant growth regulators: recent advances // *Plant Growth Regulat.* -1990.-Т.9.№.2.- P.113-126.

136. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. — 5th. — W. H. Freeman, 2008.
137. N. H. Barton, D. E. G. Briggs, J. A. Eisen. Evolution. — Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. — C. 38.
138. Parak F., Frolov E. N., Mössbauer R. L., Goldanskii V. I. Dynamics of metmyoglobin crystals investigated by nuclear gamma resonance absorption // J Mol Biol. — 1981. — T. 145, вып. 4. — С. 825—833.
139. "Rapid Growth Found in Oxygen-Starved Ocean 'Dead Zones'", NY Times, 14 August 2008
140. Saltzman, A.; Birol, E.; Bouis, H. E.; Boy, E.; De Moura, F.F.; Islam, Y.; Pfeiffer, W. H. (2013). "Biofortification: progress toward a more nourishing future". *Global Food Security*. 2: 9–17.
141. Sandor Ellix Katz, *The Art of Fermentation: An In-Depth Exploration of Essential Concepts and Processes from around the World*, Chelsea Green Publishing, 2012, 528 p.
142. Scheller HV, Ulvskov P., Hemicelluloses. // *Annu Rev Plant Biol*. 2010;61:263-89. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
143. 172. Senes J.C. Solid state fermentation of starchy substrates. UFU // Intern. conf. – Guatemala City, 1978. P. 131.
144. 173. Silva M., Jacobus N.V., Denek C. Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain // *Antimicrobial Agents and Chemother*, 1987. – Vol. 71. – N.8.- P. 1231-1233.
145. Starr C., McMillan B. 2.1. Atoms and Elements // *Human Biology*. — 11 ed. — Cengage Learning, 2014. — P. 16. — 608 p.
146. 175. Stoltz D.R. Suspected cyclopopiazonic acid of quail in Indonesia. First Asia-pacific Congress on Animal and Microbial.Toxins 24 – 37 June 1987. – Vol.26. – N.1. – P. 39-40.
147. Stryer, Lubert; Berg, Jeremy Mark; Tymoczko, John L. (2007). *Biochemistry*. San Francisco: W.H. Freeman.

148. Wilke, B.M. (1987). "Fluoride-induced changes in chemical properties and microbial activity of mull, moder and mor soils". *Biology and Fertility of Soils*. **5**: 49–55.
149. Yahav T., Maimon T., Grossman E., Dahan I., Medalia O. Cryo-electron tomography: gaining insight into cellular processes by structural approaches // *Curr Opin Struct Biol*. — 2011. — Т. 21, вып. 5. — С. 670—677.

## **Приложение 1**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ ФГБОУ ВО  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ»

СОГЛАСОВАНО

№ \_\_\_\_\_  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017

УТВЕРЖДАЮ

И. о. проректора по научной работе  
Бабин Ю.В.  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ ПРОИЗВОДСТВА МИКРОБНОГО НУТРИЕНТА  
ПОЧВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ, СОДЕРЖАЩЕГО СИМБИОТИЧЕСКИЕ  
АССОЦИАЦИИ ДРОЖЖЕЙ И БАКТЕРИЙ, НА БАЗЕ КУКУРУЗНОГО СТЕБЛЯ И  
СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ

Руководитель разработки:  
профессор кафедры «Биотехнология  
и технология продуктов биоорганического  
синтеза», доктор технических наук

 Борисенко Е.Г.

Исполнитель:  
Аспирант

 Мадзу О.Б.

Москва, 2017

## **Приложение 2**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ ФГБОУ ВО  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ»

ОКПД 2 20.15.80.190

Группа Л15  
(ОКС: 65.080)

СОГЛАСОВАНО

№ \_\_\_\_\_  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017



И. о. проректора по научной работе  
Бабин Ю.В.

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017

МИКРОБНЫЙ НУТРИЕНТ ПОЧВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЙ  
СИМБИОТИЧЕСКИЕ АССОЦИАЦИИ ДРОЖЖЕЙ И БАКТЕРИЙ, НА БАЗЕ  
КУКУРУЗНОГО СТЕБЛЯ И СТОЛОВОЙ СВЕКЛЫ

Технические условия

ТУ 20.15.80-001-02068634-2017

Введены впервые

Дата введения в действие «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017

Руководитель разработки:  
профессор кафедры «Биотехнология  
и технология продуктов биоорганического  
синтеза», доктор технических наук

\_\_\_\_\_  
Борисенко Е.Г.

Исполнитель:  
Аспирант

\_\_\_\_\_  
Мадзу О.Б.

Москва, 2017

## **Приложение 3**

## Расчет экономической эффективности производства растительно-микробного нутриента на базе кукурузного стебля и столовой свеклы

Ежегодное количество готовой продукции составляет 1500 т.

Предлагаемые нами продукты должны быть доступны по цене для широких слоев населения региона центральной Африки, поэтому ниже приведен расчет оптовой цены микробного нутриента, полученного на базе кукурузного стебля и столовой свеклы

Калькуляция себестоимости продукции

Единица продукции – тонна

Калькуляционная единица – рубль

Таблица 1. Расчет расходов сырья и материалов

Сырье, материалы, энергетические затраты	Затраты на единицу продукции			Затраты на год
	Норма расхода на единицу продукции	Цена единицы сырья, руб.	Сумма, руб. коп.	
Сырье:	На 1т	На 1 кг (л)	На 1 т	
Вода (технолог. процесс)	1000	1,5	1500	2250000
Кукурузный стебель	1400	0,5	700	1050000
Столовая свекла	600	3	1800	2700000
Итого сырья			4000	6000000
Вспомогательные материалы:				
Полиэтиленовые мешки	100 шт.	1,5	150	225000
этикетки	100 шт.	0,2	20	30000
Скотч упаковочный	10 шт.	15	150	225000
Моющий агент (каустическая сода)	1 кг	8	8	12000
Итого материалов			328	492000
Энергозатраты:				
Газ	10 м <sup>3</sup>	4,5	45	67500
Вода	70 м <sup>3</sup>	5	350	525000
Электроэнергия	500 кВт·ч	3,1	1550	2325000

Итого:			1945	2917500
--------	--	--	------	---------

Себестоимость это денежное выражение непосредственных затрат предприятия на производство и реализацию продукции.

Прибыль предприятия от реализации продукции определяется разностью между оптовой ценной и себестоимостью.

Статья калькуляции себестоимости в процентах к заработной плате:

- Отчисления на социальные нужды – 30%
- Расходы на подготовку и освоение производства – 5%
- Общепроизводственные расходы – 200%
- Общехозяйские расходы – 120%
- Коммерческие расходы – 2%

Таблица 2. Калькуляция себестоимости продукции

Наименование статей затрат	Себестоимость единицы продукции (т)	Затраты на весь выпуск
1. Сырье и материалы – всего	4328	6492000
2. Топливо и энергия на технологические цели	1945	2917500
3. Заработная плата основная и дополнительная производственных рабочих	4125,15	6187725
4. Отчисления на социальные нужды	1237,5	1856250
5. Расходы на подготовку и освоение производства	206,2	309300
6. Общепроизводственные расходы	8250,3	12375450
7. Общехозяйственные расходы	4950,18	7425270
8. Коммерческие расходы	82,5	123750
<b>Полная себестоимость</b>	<b>25124,83</b>	<b>37687245</b>

### **Расчет оптовой цены**

$C_{\text{опт.}} = C_{\text{ед.}} + N_{\text{приб.}}$ , где  $C_{\text{опт.}}$  – цена за 1 т готовой продукции, руб.;  $C_{\text{ед.}}$  – себестоимость 1 т готовой продукции, руб.;  $N_{\text{приб.}}$  – принимаемая норма прибыли, 20%

$$C_{\text{опт.}} = 25124,83 + 5024,97 = 30149,8 \text{ руб/т}$$

### **Прибыль:**

$$\text{Пр.} = C_{\text{опт.}} - C_{\text{ед.}} = 30149,8 - 25124,83 = 5024,97 \text{ руб/т}$$

### **Прибыль годовая:**

$$\text{Пр}_{\text{год.}} = \text{Пр} \cdot Z, \text{ где } Z \text{ – плановый выпуск}$$

$$\text{Пр}_{\text{год.}} = 5024,97 \text{ руб/т} \cdot 1500 \text{ т/год} = 7537455 \text{ руб/год}$$

Товарная продукция – объем всей произведенной предприятием за определенный период (как правило, за год) конечной продукции, исчисленный в денежном выражении.

### **Товарная продукция:**

$$\text{ТП} = C_{\text{опт.}} \cdot Z_{\text{корр.}}, \text{ где } Z_{\text{корр.}} \text{ – выпуск продукции в год.}$$

$$\text{ТП} = 30149,8 \text{ руб/т} \cdot 1500 \text{ т/год} = 45224700 \text{ руб/год}$$

### **Затраты на 1 рубль товарной продукции:**

$$Z = C_{\text{год.}} / \text{ТП} = 37687245 \text{ руб/т} / 45224700 \text{ руб/год} = 0,83 \text{ руб/руб}$$

**Рентабельность** – относительный показатель экономической эффективности.

Рентабельность:

$$R = \text{Пр} / C_{\text{ед.}} \cdot 100\% = (5024,97 \text{ руб/т}) / (25124,83 \text{ руб/т}) \cdot 100\% = 20\%$$

### Технико-экономические показатели конечного продукта

В таблице 3 представлены технико-экономические показатели микробного нутриента, полученного из кукурузного стебля и столовой свеклы, единица продукции – тонна.

**Таблица 3. Технико-экономические показатели**

Показатели	Единица измерения	Величина
Годовой выпуск продукции	т	1500
Себестоимость единицы продукции (т)	Руб	25124,83
Себестоимость годовая	Руб	37687245
Проект оптовой цены	Руб	<b>30149,8</b>
Прибыль на 1т	Руб	5024,97
Прибыль годовая	Руб	7537455
Товарная продукция	Руб	45224700
Затраты на 1 руб товарной продукции	Руб	0,83
Рентабельность	%	20

Следовательно, средняя стоимость 1 кг готового продукта составила 30,1 рублей.

## **Приложение 4**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ ФГБОУ ВО  
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ»

СОГЛАСОВАНО

№ \_\_\_\_\_  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017



УТВЕРЖДАЮ

И. о. проректора по научной работе

Бабин Ю.В.

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2017

**АКТ**

**О проведении исследования влияния микробного нутриента на рост  
сельскохозяйственных культур**

Мы, нижеподписавшиеся: зав. кафедрой «Физиологии растений» РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, д.б.н, проф. Тараканов И.Г., д.б.н, проф. Сидоренко О.Д. кафедры «Микробиология и иммунология» и сотрудники кафедры «Биотехнология и технология продуктов биорганического синтеза» МГУПП, зав. кафедрой, д.б.н, проф. Бутова С.Н., д.т.н, проф. Борисенко Е.Г., аспирант Мадзу О.Б. составили настоящий акт о том, что в лаборатории «Искусственного климата» РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева были проведены исследования влияния нутриента на рост сельскохозяйственных культур, содержащего дрожже-бактериальные ассоциации (*Pichia guilliermondii* Ap и *Azotobacter chroococcum* sp), полученного на базе кукурузного стебля и пульпы столовой свеклы.

Приготовление нового микробного нутриента осуществляли в два этапа: глубинная ферментация и твердофазная ферментация. В глубинной ферментации культивируют дрожже-бактериальную ассоциацию (*Pichia guilliermondii* Ap и *Azotobacter chroococcum* sp) на базе стерильной свекольной пульпы. Для проведения процесса твердофазной ферментации в питательную среду добавляли стерильный кукурузный стебель.

Глубинная ферментация: в качалочные колбы объемом 750 см<sup>3</sup> добавляли свекольную пульпу и воду в соотношении 1:2, тщательно перемешивали и стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин и охлаждали. Добавляли посевную культуру (*Pichia guilliermondii* Ap и *Azotobacter chroococcum* sp) и культивировали в колбах на качалке при 220 об/мин. и температуре 30±2°С в течение 48ч.

Твердофазная ферментация: стерилизовали измельченный кукурузный стебель в автоклаве в течение 40 мин., охлаждали до 30±2°С и добавляли посевной материал, полученный при глубинной ферментации до получения 50%-ной влажности и оставляли в термостате при 30±2°С в течение 72ч. После ферментации полученный продукт хранят в температуре от 5 до 15°С.

В асептически отобранных пробах готового продукта определяли физико-химические и биологические показатели. Таблица 1. Физико-химические и биологические показатели дрожже-бактериального стимулятора как микробного нутриента почвенного назначения

№ п/п	Наименование показателя	Характеристика показателя
1	рН, не менее	6,1
2	Фосфор, %	0,30
3	Кальций, %	0,20
4	Калий, %	0,014
5	Магний, %	0,05
6	Железо, %	0,024
7	Массовая доля сырого протеина, %	35,8
8	Микроорганизмы, КОЕ/г(см <sup>3</sup> ) не менее - <i>Azotobacter chroococcum</i> sp - <i>Pichia guilliermondii</i> Ap	1·10 <sup>9</sup> 4·10 <sup>9</sup>
9	Клетчатка, %	6,2
10	Мальтоза, %	0,141
11	Зола, %	2,3
12	Глюкоза, %	0,078
13	Массовая доля сухих веществ, %	50
14	Внешний вид	Твердый субстрат неоднородного размера от светло-коричневого до коричневого цвета

### Заключение

Экспериментально установлено, что микробный нутриент благоприятно воздействовал на рост сельскохозяйственных культур (тритикале, салаты), может быть рекомендован к применению в сельском хозяйстве.

**Представители кафедры «Физиологии растений» и «Микробиология и иммунология» РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева**

Зав. кафедрой, д.б.н., проф.

Тараканов И.Г.

Д.б.н., проф.

Сидоренко О.Д.



**Представители кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» МГУПП**

Зав. кафедрой, д.б.н., проф.

Бутова С.Н.

Научный руководитель, д.т.н., проф.

Борисенко Е.Г.

Аспирант

Мадзу О.Б.

## **Приложение 5**

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

Наименование показателей безопасности	Единицы измерения	Нормативные документы на методы испытаний	Допустимые уровни значений определяемых показателей	Предел количественного определения (ПКО)	Фактическое значение показателей по результатам испытаний проб
Общие аминокислоты					
Аспарагиновая кислота	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,15±0,02
Треонин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,07±0,01
Серин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,07±0,01
Глутаминовая кислота	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,32±0,05
Глицин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,10±0,01
Аланин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,12±0,02
Валин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,11±0,02
Изолейцин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,07±0,01
Лейцин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,12±0,02
Тирозин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,06±0,01
Фенилаланин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,09±0,01
Гистидин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,03±0,01
Лизин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,07±0,01
Аргинин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,07±0,01
Пролин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,05±0,01
Сумма аминокислот	%	-	-	-	1,47

\*вне области аккредитации

Заведующий лабораторией

Заместитель начальника отдела  
химико-токсикологических исследований

Главный специалист

Начальник отдела приема проб (образцов)  
и выдачи документов по результатам исследований

В.Л.Сухова

С.Д.Добрев

Г.П.Кайдарова

О.В.Шнитцер

«02» декабря 2016 г.

Примечание:

Данный протокол испытаний касается только образцов, подвергнутых этим испытаниям. Запрещается частичное или полное копирование, перепечатка протокола без разрешения ФГБУ «Центр оценки качества зерна»

Страница 2 из 2

## **Приложение 6**

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

Наименование показателей безопасности	Единицы измерения	Нормативные документы на методы испытаний	Допустимые уровни значений определяемых показателей	Предел количественного определения (ПКО)	Фактическое значение показателей по результатам испытаний проб
Общие аминокислоты					
Аспарагиновая кислота	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,18±0,03
Треонин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,10±0,01
Серин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,09±0,01
Глутаминовая кислота	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,23±0,03
Глицин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,12±0,02
Аланин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,13±0,02
Валин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,15±0,02
Изолейцин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,09±0,01
Лейцин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,17±0,02
Тирозин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,08±0,01
Фенилаланин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,11±0,02
Гистидин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,04±0,01
Лизин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,11±0,02
Аргинин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,09±0,01
Пролин	%	ГОСТ 32195-2013*	-	0,02	0,10±0,02
Сумма аминокислот	%	-	-	-	1,77

\*вне области аккредитации

Заведующий лабораторией

Заместитель начальника отдела  
химико-токсикологических исследований

Главный специалист

Начальник отдела приема проб (образцов)  
и выдачи документов по результатам исследований


В.Л.Сухова  
С.Д.Добрев  
Г.П.Кайдарова  
О.В.Шнитцер

«02» декабря 2016 г.

Примечание:

Данный протокол испытаний касается только образцов, подвергнутых этим испытаниям. Запрещается частичное или полное копирование, перепечатка протокола без разрешения ФГБУ «Центр оценки качества зерна»

Страница 2 из 2

## **Приложение 7**

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

Показатели качества:

№ п/п	Наименование показателей	Ед. измерения	Значение			НД на методы испытаний
			при испытаниях	по НД	Предел количественного определения (ПКО)	
1	2	3	4	5	6	7
1	Массовая доля сырой клетчатки	%	6,2±1,2	-	-	ГОСТ 31675-2012
2	Массовая доля сырого жира	%	0,27	-	-	ГОСТ 32905-2014
3	Массовая доля сырой золы	%	2,3	-	-	ГОСТ 28178-89
4	Массовая доля фосфора	%	0,30±0,06	-	-	ГОСТ 26657-97
5	Массовая доля кальция	%	0,20±0,05	-	-	ГОСТ 26570-95
6	Калий	%	0,014±0,02	-	-	ГОСТ 26427-85
7	Магний	%	0,005±0,001	-	-	ГОСТ 26428-85
8	Железо	%	0,0024±0,0004	-	-	МУ по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства М.ЦИНАО – 1992
9	Гранулометрический состав: Более 10 мм 10 – 5 мм 5 – 2 мм 2 – 1 мм 1 – 0,5 мм Менее 0,5 мм	%	- 1,80 19,6 24,7 26,0 27,9	-	-	ГОСТ 12536-2014

Главный специалист



И.Н. Тынянская

Страница 2 из 3

Показатели безопасности и пищевой ценности:

Наименование показателей безопасности	Единицы измерения	Нормативные документы на методы испытаний	Допустимые уровни значений определяемых показателей	Предел количественного определения (ПКО)	Фактическое значение показателей по результатам испытаний проб
Общие аминокислоты					
Аспарагиновая кислота	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,22±0,02
Треонин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,12±0,01
Серин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,11±0,01
Глутаминовая кислота	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,25±0,03
Глицин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,13±0,01
Аланин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,15±0,02
Валин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,13±0,01
Изолейцин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,10±0,01
Лейцин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,16±0,02
Тирозин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,10±0,01
Фенилаланин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,10±0,01
Гистидин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,04±0,01
Лизин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,11±0,01
Аргинин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,09±0,01
Пролин	%	ГОСТ 32195-2013	-	0,02	0,09±0,01
Сумма аминокислот	%	-	-	-	1,90
Сахароза	%	Р 4.1.1672-03	-	0,1	<0,1

Заведующий лабораторией

В.Л. Сухова

Начальник отдела контроля и изучения качества товарных ресурсов зерна и продуктов его переработки, комбикормов и комбикормового сырья

Т.Н. Никонорова

Начальник отдела агрохимических исследований

А.И. Попов

Заместитель начальника отдела химико-токсикологических исследований

С.Д. Добрев

Главный специалист отдела приема проб (образцов) и выдачи документов по результатам исследований

И.Н. Тынянская

Начальник отдела приема проб (образцов) и выдачи документов по результатам исследований

О.В. Шнитцер

27 апреля 2017г.

Примечание: Данный протокол испытаний касается только образцов, подвергнутых этим испытаниям. Запрещается частичное или полное копирование, перепечатка протокола без разрешения ФГБУ «Центр оценки качества зерна»

## **Приложение 8**



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ -  
МСХА ИМЕНИ К.А. ТИМИРЯЗЕВА



## Сертификат участника

*Международной конференции  
к 120 -летию создания кафедры микробиологии и  
к 150 -летию со дня рождения профессора Н.Н. Худякова  
7 - 8 декабря 2016 г.*

Награждается

Мадзу О.Б., Борисенко Е.Г., Родригес В.И.,

Сидоренко О.Д

за доклад на тему

БАКТЕРИАЛЬНО-ДРОЖЖЕВЫЕ АССОЦИАЦИИ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Декан  
факультета почвоведения,  
агрохимии и экологии, профессор



Б.А. Борисов

МОСКВА 2016