

Министерство науки и высшего образования РФ
Алтайский государственный университет

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ОБЩЕСТВО В XXI ВЕКЕ

СБОРНИК СТАТЕЙ



Барнаул

Издательство
Алтайского государственного
университета
2018

УДК 6:57(08)+3(08)
ББК 30.16я43+60я43
Б 63

Редакционная коллегия:

доктор биологических наук М.М. Силантьева – главный редактор;
доктор биологических наук А.В. Мацюра;
доктор биологических наук А.В. Поляков;
доктор биологических наук В.В. Ревин;
доктор биологических наук Г.Г. Соколова;
кандидат биологических наук Л.П. Хлебова;
доктор биологических наук И.Г. Чухина;
доктор биологических наук А.И. Шмаков

Б 63 **Биотехнология и общество в XXI веке** [Текст] : сборник статей /
под ред. М.М. Силантьевой. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2018. –
475 с.

ISBN 978-5-7904-2310-9

Сборник содержит статьи, подготовленные на основе материалов докладов Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология и общество в XXI веке», которая состоялась в рамках II Международного биотехнологического симпозиума «BioAsia – 2018» (Барнаул, 24–26 сентября 2018 г.).

Представлены результаты исследований в области пищевой и промышленной биотехнологии, сельскохозяйственной, природоохранной и лесной биотехнологии, а также в области биоинженерии, молекулярной генетики и биоинформатики.

Сборник рассчитан на ученых, специализирующихся в области биотехнологии.

УДК 6:57(08)+3(08)
ББК 30.16я43+60я43

Сборник подготовлен при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
(проект 18-016-20022 организации
Всероссийской научно-практической конференции
с международным участием «Биотехнология и общество в XXI веке»)

ISBN 978-5-7904-2310-9

© Оформление. Издательство Алтайского
государственного университета, 2018

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 632.937

Н.Е. Агансонова

Всероссийский научно-исследовательский институт
защиты растений (Санкт-Петербург, Пушкин, Россия)

Эффективность продуктов метаболизма симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод против *Globodera rostochiensis* W. на картофеле

Получена высокая биологическая эффективность продуктов метаболизма симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод (*Xenorhabdus*, *Enterobacteriaceae*) против золотистой нематоды *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923; Behrens, 1975) (Tylenchida: Heteroderidae) на картофеле *Solanum tuberosum* L. (Solanaceae). Исследование проводилось в условиях Северо-Западного региона Российской Федерации (Ленинградская область) на дерново-подзолистой суглинистой почве. Биологическая эффективность предпосадочной обработки почвы составляла 93%. Применение продуктов метаболизма симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод увеличило урожайность картофеля на 28%. Для оценки фотосинтетического аппарата растений исследовано влияние обработки на количество фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a*, *b* и каротиноидов) в листьях картофеля. Содержание фотосинтетических пигментов определяли спектрофотометрическим методом. Биохимический анализ определения содержания фотосинтетических пигментов проводился со свежей массой листьев. Растительное сырье было собрано на стадии цветения. Благодаря эффективности продуктов метаболизма симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод в защите картофеля против золотистой нематоды содержание фотосинтетических пигментов в листьях увеличилось. В фазе цветения экспериментальные растения картофеля содержали большую концентрацию фотосинтетических пигментов, чем контрольные растения. Результаты показали увеличение уровней содержания хлорофилла *a*, *b* и каротиноидов в листьях картофеля на 17–27%. Продукты метаболизма симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод

могут эффективно использоваться в интегрированных системах защиты картофеля. Симбиотические бактерии *Xenorhabdus* sp. энтомопатогенных нематод и их метаболиты получены из Всероссийского НИИ защиты растений (Санкт-Петербург, Пушкин, Россия).

Ключевые слова: картофель, *Globodera rostochiensis* W., продукты метаболизма симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод, Северо-Западный регион РФ.

Введение. Картофелеводство – одно из приоритетных направлений развития сельского хозяйства в Российской Федерации. Разработка и внедрение систем рационального применения средств химической и биологической защиты сельскохозяйственных растений будет составлять Приоритеты и перспективы научно-технологического развития Российской Федерации на ближайшие 15 лет.

В РФ против золотистой картофельной нематоды *Globodera rostochiensis* W., экономически значимого патогена картофеля *Solanum tuberosum* L. (Solanaceae), зарегистрирован в 2018 г. только один препарат – нематодцид Видат 5Г, Г (действующее вещество: оксамил, 50 г/кг, химический класс: карбаматы). Нематодцид имеет 2-й класс опасности (высокоопасное соединение).

В современных системах интегрированной защиты картофеля от вредных организмов существует ограниченный ассортимент зарегистрированных биопрепаратов, в частности, на основе микроорганизмов рр. *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Trichoderma*, поэтому разработка технологии применения экологически безопасных продуктов метаболизма симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод (ПМСБ ЭН) рода *Xenorhabdus* семейства *Enterobacteriaceae* для защиты культуры в период вегетации особенно актуальна.

Предварительная оценка эффективности ПМСБ ЭН против золотистой картофельной нематоды в садковом вегетационном опыте при искусственном заражении способом пролива почвы перед посадкой клубней картофеля показала, что применение биопрепарата снижало зараженность корней фитогельминтом, уменьшало морфологические параметры паразита и увеличивало массу клубней нового урожая (Агансонова и др., 2013).

Известно, что одним из показателей, дающим представление о потенциальных возможностях растений формировать урожай, является степень развития фотосинтетического аппарата в течение вегетации.

Заражение картофеля золотистой картофельной нематодой значительно влияет на физиолого-биохимические процессы, происходящие в растении, в частности, снижается уровень содержания фотосинтетических пигментов в листьях, что существенно снижает фотосинтетическую активность. Поэтому одним из этапов оценки фотосинтетического потенциала картофеля является определение количества пигментов в листьях в процессе онтогенеза культуры после проведения защитных мероприятий против фитопаразитов.

Цель исследования – оценить биологическую эффективность использования ПМСБ ЭН для защиты картофеля против золотистой картофельной нематоды при естественном заражении фитогельминтом и влияние обработки на содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b*, каротиноидов) в листьях.

Материалы и методы исследований. Исследования проводили на картофеле сорта Памяти Осиповой. Почвенно-климатическая зона: I – зона подзолистых и дерново-подзолистых почв таежно-лесной области, Северо-Западный регион РФ возделывания сельскохозяйственных культур (Санкт-Петербург, Ленинградская область).

Почва опытного участка: дерново-подзолистая, легкосуглинистая, содержание гумуса – 2,2%, подвижного фосфора и калия – 56,2 и 87,4 мг/кг почвы, соответственно, рНКСl – 4,4. Предшественник – культура картофеля.

Лабораторный образец ПМСБ ЭН, представляющий собой бактериальную суспензию, состоящую из активных метаболитов и клеток симбиотических бактерий р. *Xenorhabdus* сем. *Enterobacteriaceae* энтомопатогенных нематод вида *Steinernema carpocapsae* получен из лаборатории микробиологической защиты растений Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений.

ПМСБ ЭН в «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов» препаратов и биологических средств, разрешенных к применению в РФ, не включены.

Объект исследования – золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923; Behrens, 1975) (*Tylenchida: Heteroderidae*), патотип R₀ 1.

Схема опыта включала однократную обработку против золотистой картофельной нематоды ПМСБ ЭН почвы (водная суспензия, титр 10⁹ клеток/мл, 50 мл/л, из расчета 1000 л/га) перед посадкой клубней картофеля. Вариант опыта сравнивали с контролем, обработанным водой (из расчета 1000 л/га). Обработка проводилась с использованием опрыскивателя «Solo-456» (Германия).

Площадь делянок – 15 м², размещение рендомизированное. Повторность опытов 4-кратная. В течение вегетационного периода на опытных делянках проводили рыхление междурядий и трехкратное окуривание.

Учет численности золотистой картофельной нематоды проводили до посадки клубней и после уборки картофеля.

С каждой повторности всех вариантов буром объемом 5 см³ отбирали пробы почвы через 10–15 см. Объем почвенной пробы – 1,5 л. Количество проб, собранных из пахотного слоя почвы (глубина 25 см от поверхности) – 20 проб/повторность. Почвенные пробы просушивали 14 дней на воздухе до воздушно-сухого состояния, тщательно перемешивали и выделяли для анализа средние пробы объемом 400 мл. Выделение цист из почвы проводили методом флотации. Зараженность почвы выражали количеством живых личинок, содержащихся в цистах, выделенных из 100 см³ почвы.

Биологическую эффективность ПМСБ ЭН оценивали по изменению количества живых личинок золотистой картофельной нематоды в опыте от аналогичного показателя в контроле и рассчитывали по формуле Хендерсона и Тилтона. Способ уборки и учет урожая картофеля: вручную, учет урожая по 10 кустов на каждой делянке, массу урожая определяли путем взвешивания всех клубней, с вычислением средней массы клубней с куста в каждом варианте опыта (Долженко, 2009).

Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов а и в, каротиноидов) в листьях картофеля в фазе цветения определяли спектрофотометрическим методом (Филиппова, 2017).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием компьютерной программы «ANOVA».

Результаты и их обсуждение. Предпосадочная обработка почвы ПМСБ ЭН (водная суспензия, титр 109 клеток/мл, 50 мл/л, 1000 л/га) обеспечила высокоэффективную экологически безопасную защиту картофеля против золотистой картофельной нематоды в почвенно-климатической зоне I (Ленинградская область). Биологическая эффективность составляла 93%.

В фазе цветения картофеля содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) в листьях в опытном варианте с применением ПМСБ ЭН превышало контрольный вариант на 17–27 %. Урожай культуры увеличился на 28%.

Полученные результаты свидетельствуют, что применение ПМСБ ЭН способом предпосадочной обработки почвы перспективно для борьбы с золотистой картофельной нематодой на картофеле.

Выводы. Высокая биологическая эффективность против золотистой картофельной нематоды, увеличение содержания фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) в листьях и урожайности клубней повышает перспективность использования продуктов метаболизма *Xenorhabdus* sp. – симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод вида *S. carpocapsae* в экологически ориентированных системах интегрированной защиты картофеля.

Библиографический список

- Agansonova N.E., Danilov L. G., Magomedov SH.A. Vliyanie produktov metabolizma simbioticheskikh bakterij ehntomopatogennyh nematod na zolotistuyu kartofel'nyuyu nematodu // Plant Protection and Quarantine. 2013. №4. С. 44–45.
- Dolzhenko V.I. (Red.). Metodicheskie ukazaniya po registracionnym ispytaniyam fungicidov v sel'skom hozyajstve. Sankt-Peterburg : All-Russian Institute of Plant Protection, 2009.
- Filipцова G.G. Fotosintez: metodicheskie rekomendacii k laboratornym zanyatiyam, zadaniya dlya samostoyatel'noj raboty i kontrolya znaniy studentov biologicheskogo fakul'teta. Minsk : Belarusian State University, 2017.

УДК 581.143.6

О.В. Бычкова¹, А. Оразов²

¹Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

²Восточно-Казахстанский государственный университет
им С. Аманжолова (Усть-Каменогорск, Казахстан)

Клональное микроразмножение плодовых, ягодных и декоративных культур в Алтайском центре прикладной биотехнологии

Рассмотрены особенности клонального микроразмножения плодово-ягодных и декоративных культур на примере земляники садовой (*Fragaria × ananassa*) и хризантемы садовой (*Chrysanthemum morifolium*).

Ключевые слова: клональное микроразмножение, земляника садовая, *Fragaria × ananassa* Duch., хризантема садовая, *Chrysanthemum morifolium* L.

В связи с развитием кластера садоводства в региональном АПК, в том числе любительского садоводства, возрастает спрос на посадочный материал. При этом потенциального покупателя интересуют не только районированные, но и малораспространенные в нашей зоне, новые сорта. Кроме того, суровый климат ведет к сокращению продуктивного периода растений за счет периодического вымерзания и зимнего иссушения (Стрельцов, Тучин, 2008).

В настоящее время методы биотехнологии получили широкое распространение в сельском хозяйстве, в том числе клональное размножение растений *in vitro*, которое используется в системе ускоренного производства оздоровленного посадочного материала плодовых и ягодных культур. При этом следует отметить, одним из основных преимуществ метода является получение генетически однородного посадочного материала, абсолютно свободного от вирусной, грибной и бактериальной инфекции (Оразбаева и др., 2012).

Целью представленного исследования являлась разработка технологии производства оздоровленного посадочного материала

плодово-ягодных и декоративных культур на примере земляники садовой (*Fragaria × ananassa*) и хризантемы садовой (*Chrysanthemum morifolium*). Работа проводилась на базе Алтайского центра прикладной биотехнологии (Алтайский государственный университет) по общепринятым методикам (Инновационные технологии..., 2010; Поляков, 2014).

Клональное размножение включает в себя несколько этапов: выбор растения-донора, изолирование эксплантов (введение в культуру *in vitro*) и получение хорошо растущей стерильной культуры (рис. (слева)); собственно микроразмножение, когда достигается *in vitro* получение максимального количества регенерантов (рис. (справа)); укоренение размноженных побегов *in vitro*. Заключительным этапом является адаптация пробирочных культур и пересадка адаптированных растений из условий искусственного климата в условия естественного полевого фона.

На этапе введения в культуру *in vitro* для получения асептического материала использовали такие способы оздоровления, как термотерапия, хемотерапия и культура апикальных меристем. Однако лишь сочетание перечисленных методов позволило достичь показателей жизнеспособности эксплантов земляники садовой на уровне 53–74%. При этом доля регенерантов, свободных от инфекции, составила 32–57%. Эффективность стерилизации хризантемы оказалась несколько выше и составила в зависимости от генотипа 62–70%.



Этапы клонального микроразмножения земляники садовой:
этап введения в культуру *in vitro* (слева),
этап собственно микроразмножения (справа)

Правильный подбор питательной среды на этапе размножения (пролиферации) в значительной степени определяет эффектив-

ность клонального микроразмножения. Так, на данном этапе происходит пролиферация пазушных побегов и меристем. Образование корней на этой ступени нежелательно, а если оно происходит в массовом порядке, то это свидетельствует о том, что состав питательной среды не оптимален. С одной стороны, при укоренении эксплантов в фазе размножения происходит восстановление коррелятивных связей, характерных для целого организма, вследствие чего роль экзогенных цитокининов, присутствующих в питательной среде, ослабевает, что ведет к снижению коэффициента размножения. С другой стороны, экзогенные цитокинины в соответствующих концентрациях препятствуют развитию нормальной корневой системы, что требует введения специального этапа укоренения для получения полностью развитых растений. Так, оптимальной средой для эффективного размножения земляники оказалась среда по прописи Мурасиге-Скуга (МС), содержащая 25 г/л сахарозы и дополненная 0,45 мг/л БАП. При этом коэффициент размножения варьировал от 5 до 13, в зависимости от сорта. Активный рост корневой системы у регенерантов земляники садовой проходил на питательных средах того же состава (МС + 25 г/л сахарозы) с добавлением гормона группы ауксинов – ИМК, в концентрации 0,40 мг/л. В случае работы с культурой хризантемы садовой сотрудниками центра была предложена схема клонального микроразмножения, несколько отличающаяся от традиционной. Использование гормонов ауксиновой природы (ИМК) в концентрации 0,05 мг/л позволило получить растения-регенеранты сорта Балтика Белая с хорошо сформированной корневой системой, длиной междоузлия – 0,71 см и коэффициентом размножения 6,1.

Этап адаптации к условиям выращивания *ex vitro* является одним из последних этапов микроразмножения растений. Неудачи данного этапа могут существенно снизить эффективность размножения *in vitro*. Использование гидропонных установок типа «Минивит» позволяет получать крупные растения-регенеранты земляники садовой с хорошо развитой корневой системой (Вечернина, 2008). При этом выпад растений составляет не более 10%. В последующем растения-регенеранты высаживали в горшки, содержащие смесь торфа и песка в соотношении 3:1 (Деменко, 2011).

Использование гидропоник на этапе адаптации при получении посадочного материала хризантем позволяет избежать или снизить выпад растений при пересадке в грунт до 5%.

Таким образом, представленная выше технология позволяет в течение 12 месяцев, с учетом времени на оздоровление и введение в культуру *in vitro*, получить свободный от вирусов исходный материал земляники садовой. В результате размножения можно производить до 600 растений-регенерантов от одного экспланта. Коэффициент размножения хризантемы несколько выше, и в течение года, в зависимости от сорта, можно получить от 500 до 800 клонов.

В коллекции Алтайского центра прикладной биотехнологии имеется 16 сортов земляники садовой, из которых 7 сортов отечественной селекции, остальные сорта созданы селекционерами Украины, Англии, США, Италии, Голландии, Франции, Дании. Ассортимент хризантемы садовой включает следующие сорта: Незнакомка, Клеопатра, Дафна, Бордо, Белоснежка, Гармония, Baltica White (Балтика Белая), Spider Pink (Паук Розовый).

Библиографический список

Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Бородулина И.Д., Эрст А.А. Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники // Известия Алт. гос. ун-та. 2008. №3(59). С. 7–10.

Деменко В.И., Лебедев В. А. Адаптация садовых растений, полученных *in vitro*, к нестерильным условиям // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии: Научно-теоретический журнал Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева. 2011. Вып. 1. С. 60–70.

Инновационные технологии возделывания земляники садовой: науч.-практ. изд. М., 2010. 88 с.

Оразбаева Г.К., Хасанов В.Т., Искаков А.Р., Швидченко В.К. Клональное размножение растений черной смородины (*Ribes nigrum* L.) *in vitro* // Вестник науки КазАТУ им. С.Сейфуллина. 2012. №1 (72) [Электронный ресурс]. URL: <http://kazatu.kz/assets/i/science/vn1201agr06.pdf>.

Поляков А.В., Линник Т.А. Производство оздоровленного посадочного материала сортов земляники садовой (*Fragaria* × *Ananassa*

Duch.) с низкой усобирающей способностью методом клонального микроразмножения *in vitro* // Вестник МГОУ. 2014. № 3. С. 35–41.

Стрельцов Ф.Ф., Тучин Р.А. Совершенствование технологии производства посадочного материала плодовых и ягодных культур // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та. 2008. № 5 (43). С. 15–18.

УДК 581.143.6

О.В. Бычкова¹, Л.П. Хлебова¹, А. Оразов²

¹Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

²Восточно-Казахстанский государственный университет
им. С. Аманжолова (Усть-Каменогорск, Казахстан)

Особенности введения в культуру *in vitro* *Rhodiola algida* (Ledeb.)

Представлены результаты оптимизации введения в культуру родиолы холодной. Подобраны типы эксплантов, предложена схема стерилизации. Индукционная среда, содержащая 1 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина, обеспечивает активную пролиферацию каллусов, формирующих при субкультивировании конгломераты почек.

Ключевые слова: родиола холодная, экспланты, стерилизация, культура *in vitro*, регенеранты.

В настоящее время более 50 000 видов растений используются в двух основных областях: в современной фитотерапии и современной аллопатической медицине (WHO, 2010). Во всем мире около 2/3 объема лекарственного сырья – сырье от естественно произрастающих лекарственных растений (Edwards, 2004). Доля культивируемых растений, используемых в фармацевтической промышленности, является довольно небольшой и составляет около 10% в Европе (Vines, 2004). Количество природных популяций постепенно уменьшается, что приводит к ло-

кальному вымиранию многих видов или деградации мест их обитания (Canter et al., 2005). По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации (ФАО) Организации Объединенных Наций ежегодно флора несет невосполнимые потери, разрушающие природные ресурсы и экологическое равновесие (The state of food ..., 2009). В течение последних лет исчезло от 4 до 10 тысяч лекарственных видов (Edwards, 2004).

Так, в 1995 г. ежегодно в РФ заготавливали до 45 тыс. тонн лекарственных растений, но даже тогда потребность в сухом сырье превышала объемы заготовки в два раза. В настоящее время из необходимых 42 тыс. тонн растительного сырья в России заготавливается лишь около 18000. В последние годы, с ростом спроса на натуральные лекарства, ежегодная потребность российских заводов в лекарственном сырье составляет около 48 тыс. тонн. Частично дефицит покрывается за счет импорта. По данным Государственного таможенного комитета (ГТК), в Россию завозится около 2,6 тыс. тонн импортного сырья – почти на 9 млн долларов (Агафонов и др., 2015).

Однако постоянное расширение торговли растительным сырьем, недостаточное количество полей для выращивания и плохое управление сбором урожая и чрезмерной нагрузкой привели к истощению природных ресурсов и сокращению биоразнообразия. Чтобы это остановить, необходимо направить усилия как на сохранение популяций растений, так и на повышение уровня знаний для устойчивого использования этих растений в медицине – традиционной, альтернативной и аллопатической (WHO, 2010).

Этот вопрос находится в центре внимания науки, которая предлагает различные варианты для решения глобальной проблемы. Одним из подходов является выращивание ценных видов в экспериментальных (лабораторных) условиях. Последнее относится к применению классических методов размножения черенками, луковичками и т.д., а также биотехнологических методов культивирования *in vitro*, клонального микроразмножения для получения большого числа идентичных растений. Современные методики также подходят для видов, трудно размножающихся *in vivo* (Khan et al., 2009).

Биотехнологические методы открывают возможности не только для более быстрого клонирования и сохранения генотипа растений (Tripathi et al., 2003; Verpoorte et al., 2002), но и для модификации их

генной информации, регуляции и экспрессии для получения ценных веществ в больших количествах или с лучшими свойствами (Khan et al., 2009; Ramachandra Rao et al., 2002). Применение интегративных подходов к выращиванию растительного сырья может стать основой для разработки в будущем новой, более эффективной, безопасной и качественной продукции. Биотехнологические методы надежны и обеспечивают непрерывные источники сырья и натуральных продуктов для пищевой, фармацевтической и косметической промышленности (Ramachandra Rao et al., 2002; Nalawade et al., 2003; Julsing et al., 2007).

Целью исследования являлась оптимизация этапа введения в культуру *in vitro* родиолы холодной (*Rh. algida* (Ledeb.)).

Для введения в культуру *in vitro* родиолы холодной (*Rh. algida*) в качестве эксплантов использовали стебли и листья. Стерилизацию проводили согласно схеме: мыльный раствор (15') → проточная вода (30') → 70% этиловый спирт (3') → 2% лизоформин (15') → постстерилизация (4-кратное промывание стерильной водой). Из 64 эксплантов лишь 25 (39%) оказались свободными от инфекции. При этом 14,1 и 9,3% эксплантов листьев и стеблей соответственно являлись жизнеспособными, т.е. формировали клеточные линии.

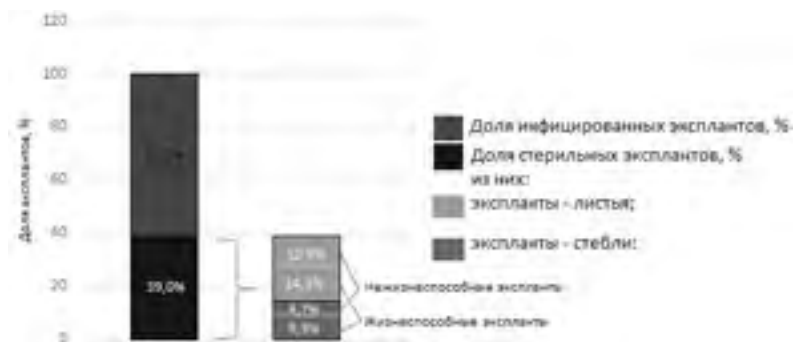


Рис. 1. Эффективность стерилизации эксплантов родиолы холодной

Оценку каллусогенных и морфогенных способностей вида проводили с использованием 11 вариантов питательных сред. Результаты влияния различных сочетаний регуляторов роста представлены в таблице 1.

Влияние гормонального состава питательной среды
на каллусогенную способность и пролиферацию *in vitro*
различных эксплантов *Rh. algida* (30-е сутки), %

Состав питательной среды	Тип экспланта	
	Листья	Сегменты стебля
1,0 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП	20,7±6,0/зеленый, глобулярный	0
0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП	24,1±3,6/светло-зеленый, рыхлый	0
0,5 мг/л НУК + 1,5 мг/л БАП	38,5±2,9/желто-зеленый, глобулярный	0
0,3 мг/л ИУК + 3,0 мг/л 2iP	23,5±3,1/зеленый, глобулярный	0
0,6 мг/л НУК + 3,0 мг/л 2iP	22,4±5,2/желто-зеленый, глобулярный	0
1,0 мг/л ИУК + 0,1 мг/л БАП	12,8±3,1 /зеленый, рыхлый	0
0,5 мг/л ИМК + 1,0 мг/л БАП	0	0
0,1 мг/л НУК + 1,0 мг/л БАП	0	0
0,2 мг/л НУК+ 2,0 мг/л зеатин	18,9±3,7/зеленый, рыхлый	10,3±3,1/ зеленый, рыхлый, некроз
0,2 мг/л ИУК+ 2,0 мг/л зеатин	26,3±3,1/зеленый, рыхлый	0
1 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетин	80,7±9,3/зеленый, глобулярный	18,2±3,3/ зеленый, рыхлый, некроз
НСР _{0,05}	19,4	7,6

Наиболее успешным для данного вида оказалось введение в культуру *in vitro* листовых эксплантов. Максимальный уровень каллусогенеза наблюдали при добавлении в исходную питательную среду регуляторов роста в сочетании 1 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина. Использование такого варианта позволило получить 80,7% каллусов, которые характеризовались хорошим ростом, имели глобулярную структуру и при дальнейшем субкультивировании формировали почки (см. рис. 2).

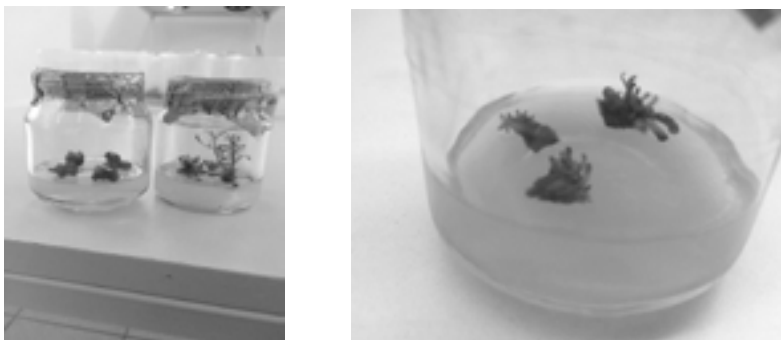


Рис. 2. Формирование почечных конгломератов (слева) и растений (справа) на каллусах *Rh. alga* в культуре *in vitro*

Аналогичные результаты были получены в исследованиях, выполненных в Китае (Sheng et al., 2005). Сочетание (0,5 мг/л НУК + 1,5 мг/л БАП) оказывало существенно менее выраженный эффект на индукционные процессы, Однако тем не менее, было успешным в 38,5% случаев. Самыми неудачными были варианты с использованием ИМК и низкой концентрацией НУК в комбинации с БАП, когда на эксплантах вообще не формировалось ни одного каллуса. Добавление 2iP в относительно высокой концентрации (3 мг/л) в сочетании с ИУК и НУК обеспечило формирование глобулярных каллусов хорошей структуры, на которых при субкультивировании инициировали почечные конгломераты, однако доля таких каллусов была невелика, что не позволяло получить достаточно большого количества растений.

Культивирование стеблевых сегментов не было успешным. Только два варианта комбинаций фитогормонов обеспечили каллусогенные процессы – (0,2 мг/л НУК+ 2,0 мг/л зеатин и 1 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетин). Доля сформированных клеточных линий составила 10,3 и 18,2% соответственно. Однако получить регенеранты не удалось, поскольку каллусы были рыхлыми, постепенно темнели, демонстрируя признаки некроза.

Таким образом, успешное введение в культуру *Rh. alga* возможно при использовании листовых эксплантов интактных растений, которые

при культивировании на индукционных средах, содержащих 1 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л кинетина, обеспечивают активную пролиферацию каллусов, формирующих при субкультивировании конгломераты почек.

Библиографический список

Агафонов В.А., Скользнева Л.И., Негроров В.В., Кирик А.И. Лекарственные растения (классификация, подходы к оценке ресурсов). Воронеж, 2015. 99 с.

Canter P.H., Thomas H., Ernst E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology // Trends in Biotechnology. 2005. Vol. 23. N 4. P. 180–185.

Edwards R. No remedy in sight for herbal ransack // New Scientist. 2004. Vol. 181. N 2429. P. 10–11.

Julsing K.M., Quax W.J., Kayser O. The engineering of medicinal plants: prospects and limitations of medicinal plant biotechnology // Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications. 2007. P. 1–8.

Khan M.Y., Aliabbas S., Kumar V., Rajkumar S. Recent Advances in Medicinal Plant Biotechnology // Indian Journal of Biotechnology. 2009. Vol. 8. P. 9–22.

Nalawade S.M., Sagare A.P., Lee C.Y., Kao C.L., Tsay H.S. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization // Botanical Bulletin of Academia Sinica. 2003. Vol. 44. N 2. P. 79–98.

Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites // Biotechnology Advances. 2002. Vol. 20. N 2. P. 101–153.

Sheng C.Z., Hu T.Q., Bi H., Yuan Y.J., Jiang Y. Effects of plant growth substances on induction and culture of callus from *Rhodiola quadrifida* // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2005. N 30(16). P. 1237–1240.

The state of food and agriculture. Rome, 2009. P. 168.

Vines G. Herbal harvests with a future: towards sustainable sources for medicinal plants // Plantlife International. 2004 [Электронный ресурс]. URL: <http://www.plantlife.org.uk/> (02.09.2018).

WHO. 2009 [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/> (02.09.2018).

УДК 332.365

О.Ю. Воронкова

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Ресурсный потенциал Алтайского края в направлении развития органического сельскохозяйственного производства *

В настоящее время рынок органических продуктов выступает одним из наиболее развивающихся и перспективных направлений мирового агропромышленного производства. Продовольственная безопасность государства, здоровье населения и качество его жизни во многом обусловлены развитием органического сельскохозяйственного производства, базирующегося на инновационных разработках в области альтернативного землепользования, сохранения природных ресурсов, прежде всего земельных. Вместе с тем незаполненная ниша рынка органической (экологически чистой) продукции и значительный земельный потенциал для развития органического земледелия создают все необходимые предпосылки для формирования и развития отечественного сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции.

Ключевые слова: развитие АПК, органическая продукция, земельные ресурсы, залежные земли, неиспользуемая пашня, политика импортозамещения, региональные программы развития.

Введение. Россия располагает всем необходимым для формирования сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции: многолетними аграрными традициями, обширными площадями сельскохозяйственных угодий, а также незначительным уровнем интенсификации и химизации АПК в сравнении с индустриально развитыми странами. Так, в среднем по стра-

* Научные исследования по данной теме проведены при поддержке РФФИ, проект номер 17-02-00639 «Разработка концепции производства органической продукции на неиспользуемых пахотных и залежных землях».

нам Еврозоны внесение минеральных удобрений составляет 192 кг/га, тогда как в России – 39, а в Алтайском крае – 3,8 кг/га.

В связи с этим становится актуальной разработка вопросов, связанных с перспективами развития сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции, и обоснованием целесообразности вовлечения для этих целей в производственный оборот залежных и неиспользуемых сельскохозяйственных земельных ресурсов.

Методы исследования. Теоретическую и методологическую основу исследования составили труды отечественных и зарубежных ученых по проблемам ведения сельскохозяйственного производства органической продукции; вопросам развития земельных отношений; научные исследования и рекомендации Российской академии сельскохозяйственных наук, законы Российской Федерации, указы Президента и постановления Правительства Российской Федерации, нормативно-правовые акты субъектов Федерации, постановления ЕС по развитию экологического сельского хозяйства, стандарты IFOAM. Методологической основой послужил системный подход, позволивший обеспечить комплексность и целенаправленность. В работе также были использованы аналитический, абстрактно-логический, расчетно-конструктивный, экономико-статистический, экономико-математический, монографический методы исследования.

Результаты исследования. Считаем, что сущность *органического сельского хозяйства* можно сформулировать как понятие, охватывающее все системы земледелия, основывающиеся на природных средствах и ресурсах, учитывающие естественные потребности растительного и животного мира, окружающей природной среды, основной целью которого выступает процесс производства экологической (органической) продукции, удостоверяемой международными и национальными экологическими сертификатами.

Проведенная оценка традиционной системы ведения земледелия показала, что даже с приложением к ней последних достижений сельскохозяйственной науки и практики аграрии уже не могут кардинально решить проблему, связанную с повышением эффективности производства отрасли. В связи с этим необходимо выработать механизм, учиты-

вающий влияние экономических, инновационных, социальных, экологических, рекреационных, национально-культурных и иных факторов, в том числе реализуемый посредством создания зональных агроэкокластеров. По нашему мнению, формирование и развитие сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции, должно отвечать следующим *системным императивам*:

- разработка концепции развития сельскохозяйственного производства органической продукции;
- параллельное ведение органического и индустриального сельскохозяйственного производства;
- механизм перехода сельского хозяйства к производству органической продукции;
- формирование зональных агроэкокластеров;
- государственное регулирование сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции, посредством целевых программ развития.

В ходе проведения научных исследований нами разработана концепция и определены основные направления формирования и реализации концепции сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции, на уровне субъекта Российской Федерации.

Формирование системы ведения органического сельского хозяйства не означает отказ от индустриального сельскохозяйственного производства. По нашему мнению, и органическая, и индустриальная системы ведения земледелия могут эффективно функционировать параллельно друг другу, постепенно трансформируясь в такую аграрную технологию, которая сможет удовлетворить текущие и предполагаемые потребности населения в качественных и экологически безопасных продуктах питания.

В целях обоснования направлений развития сельскохозяйственного производства органической продукции целесообразным представляется выявление факторов, способствующих развитию рынка органического продовольствия на следующих уровнях: государственном, региональном и сельхозтоваропроизводителем.

В сложившихся условиях развития российского АПК можно выделить ряд причин, замедляющих развитие сельского хозяйства,

ориентированного на производство органической продукции: отсутствие интереса к принципам органического производства со стороны руководителей сельскохозяйственных организаций, что часто обусловлено их консерватизмом по отношению к нововведениям, недостатком необходимой информации; трудности с инвестированием ориентированных на органическое производство проектов в АПК; отсутствие рынка сбыта органической продукции; недостаток квалифицированных специалистов в области органического земледелия и сертификации органической продукции.

Для отечественной экономики, где около 27% численности населения проживают в сельской местности и более 12% населения в трудоспособном возрасте занято в сфере сельскохозяйственного производства, формирование и развитие сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции, позволит решить не только проблемы экологической безопасности продуктов питания и окружающей природной среды, но также и социальные проблемы сельских территорий посредством повышения уровня занятости сельских жителей.

Сельское хозяйство играет весомую роль в формировании экономики края и уклада жизни населения, на его долю приходится более 18% валового регионального продукта против 6–7% по России в целом. В сельской местности проживает около 45% населения края. Алтайский край обладает огромным сельскохозяйственным потенциалом, занимает первое место в России по площади пашни (6,5 млн га), из которой более 75% – плодородные черноземы. По объему производства валовой продукции сельского хозяйства край находится на первом месте среди регионов Сибирского федерального округа и входит в первую десятку регионов Российской Федерации. На его долю приходится порядка 4% российского производства зерна, 3 – маслосемян подсолнечника, 15 – льна-долгунца, 5 – молока, 3 – картофеля, около 3 – мяса и яиц, около 2% сахарной свеклы и овощей.

Значителен вклад Алтайского края в решение проблемы продовольственной безопасности страны. За пределы региона ежегодно вывозится 85% производимой крупы, около 70 – муки и жирного сыра, 60 – макаронных изделий, более 30% молоко- и мясопродуктов. Алтайский край располагает всеми необходимыми ресурсами для пе-

перехода к использованию принципов ориентированного на органическое производство сельского хозяйства (Vorontkova, 2014).

Переход к сельскохозяйственному производству органической продукции должен отвечать целям и стратегии развития каждого отдельного сельскохозяйственного производителя. Формирование методической базы сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции на основе системного подхода, нами предлагается рассматривать как взаимодействие взаимообусловленных экологических и экономических процессов в направлении обеспечения эффективности сельскохозяйственного производства путем повышения экологического качества земельных угодий и производимой продукции.

Значимая роль в направлении эффективности производства органической продукции сельского хозяйства должна быть отведена разработке государственных программ поддержки сельскохозяйственных организаций, ориентированных на производство органической продукции. Реализация региональных целевых программ позволяет повысить эффективность производства в отдельных сегментах ее целевой направленности за счет адресной поддержки получателей субсидий и постоянного контроля со стороны уполномоченных органов за рациональным и целевым использованием предоставленных бюджетных средств. Нами предложен механизм формирования и реализации региональных целевых программ развития АПК.

На основании проведенного исследования был разработан проект краевой целевой программы «Вовлечение в сельскохозяйственное производство не используемых по целевому назначению пахотных и залежных земель сельскохозяйственного назначения Алтайского края в целях производства органической продукции на период 2017–2022 годы», направленной на более полное и эффективное использование пахотных угодий сельскохозяйственными товаропроизводителями, повышение эффективности их хозяйственной деятельности, а также рост объемов производства органической сельскохозяйственной продукции в Алтайском крае.

Ожидаемые результаты реализации программных мероприятий:

- 1) увеличение доли используемых по целевому назначению пахотных угодий к 2022 г. до 100% по отношению к уровню 2015 г.;

- 2) вовлечение в сельскохозяйственное производство не используемых по целевому назначению пахотных угодий площадью 207 тыс. га и залежных земель площадью 110 тыс. га с целью производства органической продукции;
- 3) создание эффективного механизма вовлечения в сельскохозяйственное производство не используемых по целевому назначению пахотных ресурсов;
- 4) воспроизводство почвенного плодородия пашни;
- 5) ежегодное планирование направлений производственного использования пахотных угодий.

Для оценки эффективности производственного использования вовлеченных в сельскохозяйственный оборот резервных земель, пригодных для производства органической продукции, органам муниципальных образований Алтайского края рекомендуется проводить оперативный мониторинг состояния земельных ресурсов, введенных в оборот, с целью принятия решений о прекращении дальнейшего субсидирования данного сельскохозяйственного товаропроизводителя при выявлении негативных факторов землепользования: снижении почвенного плодородия, ухудшении качественного состояния площади пашни, а также при урожайности возделываемых сельскохозяйственных культур значительно ниже средневзвешенной в данном муниципальном образовании.

Мероприятия Программы направлены на повышение эффективности сельскохозяйственного производства и формируют предпосылки к обеспечению продовольственной безопасности как Алтайского края, так и Российской Федерации в целом за счет увеличения объема производства органической продукции сельского хозяйства.

На основании стратегических планов развития органического сектора сельского хозяйства Алтайского края, а также разработанной авторами краевой целевой программы «Вовлечение в сельскохозяйственное производство не используемых по целевому назначению пахотных и залежных земель сельскохозяйственного назначения Алтайского края в целях производства органической продукции на период 2017–2022 годы» рассчитан прогноз производства продукции АПК Алтайского края на период 2017–2027 гг.

В долгосрочном периоде (2017–2027 гг.) планируется доведение доли органической сельскохозяйственной продукции Алтайского края по группе зерновых культур до 10,2%, льну – до 11,4, сахарной свекле – до 11,5, подсолнечнику – до 11,7, картофелю – до 15,1% от общего объема производства. В отрасли животноводства под органические технологии будет отведено свыше 12% производства молока и около 14% производства мяса.

Выводы. Под сельским хозяйством, ориентированным на производство органической продукции, нами предложено понимать параллельное ведение традиционно сложившейся индустриальной и системы производства, ориентированной на производство органической сельскохозяйственной продукции, с постепенным увеличением доли органического сектора на основе рационального, территориально адаптированного землепользования с минимально обоснованной химизацией агротехнических и технологических процессов сельскохозяйственного производства. Уточненные теоретические основы сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции, позволяют более эффективно решать проблему рационального использования земельного потенциала регионов путем вовлечения в производственный сельскохозяйственный оборот залежных и неиспользуемых пахотных угодий, определяемых как резерв земель, пригодных для производства органической продукции.

Формирование системы ведения органического сельского хозяйства не означает отказ от индустриального сельскохозяйственного производства. По нашему мнению, и органическая, и индустриальная системы ведения сельскохозяйственного производства могут эффективно функционировать параллельно друг другу, постепенно трансформируясь в такую аграрную технологию, которая сможет удовлетворить текущие и предполагаемые потребности населения в качественных и экологически безопасных продуктах питания.

Концентрация земельных, материальных, финансовых, трудовых ресурсов в направлении развития сельского хозяйства, ориентированного на производство органической продукции, не только открывает возможности увеличения производства отечественных органических продуктов, но позволяет снизить зависимость от им-

порта, а также будет способствовать повышению качества и экологической безопасности продукции, развитию процессов диверсификации сельского хозяйства и сопутствующих отраслей АПК.

Библиографический список

Dzhabarova Y. The Level of Awareness – a Driving Factor in the Consumer Behavior on the Bulgarian Organic Market // *Agricultural science*. 2011. Vol. 7(3). P. 101–105.

Grzelak P., Maciejczak M. Comparison between the United States and Poland of consumers' perceptions of organic products // *Studies in agr. economics*. 2013. Vol. 115(1). P. 47–56.

Smoluk-Sikorska J., Luczka-Bakula W. Sale of organic food in specialist and general retail grocery outlets – a comparative analysis // *Acta scientiarum Polonorum: Oeconomia*. 2013. N 12(1). P. 35–44.

Sokolova Zh. Market for organic products in Russia: current state and development potential // *Economics of agriculture of Russia*. 2014. N 5. P. 29–37.

Voronkova O. Yu. Unused arable land is an important resource organic food production // *Agrarian and industrial complex: economy, management*. 2014. N 10. P. 51–59.

Voronkova O. Yu., Kundius V. A., Mikhailushkin P. V. Strategic priorities of development of regional agro-food systems, focusing on the production of organic products Krasnodar, 2015. 194 p.

Zhidkikh A.A., Voronkova O. Yu., Elchishchev E. A. Regionalization – as an instrument of engagement in agricultural use of unused arable lands (cluster model) Barnaul, 2015. 123 p.

УДК 631.147

О.А. Высоцкая

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Формирование спроса на рынке биотехнологических продуктов для органического сельского хозяйства *

Рынок биотехнологических продуктов для органического сельского хозяйства, с одной стороны, является перспективным рынком, а с другой – имеет много факторов, сдерживающих его развитие. Тем не менее перспективы формирования спроса на этом рынке напрямую коррелируют с перспективами развития рынка органической продукции. В статье проанализированы факторы, препятствующие формированию спроса на биопродукты для органического АПК, а также факторы, которые способствуют развитию данного рынка.

Ключевые слова: спрос, биотехнологии, органическое сельское хозяйство, трансфер технологий.

В соответствии с прогнозом долгосрочного социально-экономического развития РФ на период до 2030 г. в перспективе сохранится динамика поступательного развития агропромышленного комплекса, определяемая следующими основными тенденциями: формирование рынка биотехнологий, активное развитие рынка органической продукции, на котором Россия имеет значительный потенциал роста в направлении экологически безопасного и здорового питания с дальнейшим выходом на мировой рынок. Актуальность темы исследования обусловлена провозглашенными на уровне государства приоритетами социально-экономического развития России, а именно направленностью на биологизацию и экологизацию АПК.

По оценкам экспертов, объем мирового рынка биотехнологий вырастет к 2020 г. до 60 млрд долларов в год, а приоритетными будут

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ проект 17-02-00639

следующие сегменты: производство кормовых добавок и биологического топлива.

Сфера биотехнологий для использования в органическом сельском хозяйстве хотя и имеет некоторые ограничения (запрет ГМО, а именно трансгенез и использование ионизирующего излучения для мутагенных целей, запрет использования техники трансплантации эмбрионов, клонирования и методов генной инженерии), тем не менее обладает и значительным потенциалом в следующих направлениях:

- 1) силосование кормов, что позволяет повышать усвоение растительной биомассы;
- 2) утилизации отходов животноводческих ферм и растениеводческих хозяйств;
- 3) получение экологически чистых органических удобрений на основе переработки отходов растениеводства и животноводства;
- 4) разработка кормовых пробиотиков и пребиотиков;
- 5) создание биологических средств борьбы с сорняками, грызунами, фитопатогенными грибами, бактериями и вирусами;
- 6) получение бактериальных удобрений;
- 7) разработка микробиологических методов рекультивации почв.

Принятие в первом чтении проекта Федерального закона «О производстве и обороте органической продукции (продукции органического производства)» является важным шагом на пути легитимизации применения биотехнологий в органическом АПК.

Предпосылкой для расширения рынка биопродуктов является рост мирового рынка органической продукции, который, по данным исследований, является одним из самых динамично развивающихся мировых рынков. Так, его рост за период с 2000 по 2016 г. составил более 400% (с 18 до 90 млрд долларов США), что составляет более 10 % всего мирового рынка сельскохозяйственной продукции. Согласно прогнозам компании Grand View Research, с 2017 по 2020 г. среднегодовые темпы роста рынка достигнут 15–16 %, т.е. 212 млрд долларов к 2020–2022 гг., что составит уже более 20% от мирового рынка продукции сельского хозяйства.

Среди стран по объёму рынка органической продукции лидируют США (доля рынка – 43%, объем – 35 млрд евро), затем следуют страны Европы (Германия – 8,6 млрд евро, Франция – 5,5 млрд евро),

далее – Китай (4,7 млрд евро), Канада (2,7 млрд евро), и другие страны, доля которых менее значительна.

Стратегия сбыта также варьируется по странам. Наблюдается четкое разделение стран по их ориентации на внешние либо внутренний рынок. Так, большая часть стран, в частности Бразилия, Азербайджан, Греция, Греция, Норвегия, Япония, Великобритания, Швеция, Швейцария и другие, развивают внутренний рынок органической продукции. Однако небольшая часть государств ориентирована преимущественно на экспорт. Так, в 2012–2014 гг. лидерами по экспорту органической продукции стали Италия (1,26 млрд евро), Нидерланды (0,783 млрд евро), Испания (0,59 млрд евро), США (0,4 млрд евро), Франция (0,393 млрд евро), Канада (0,37 млрд евро), КНР (0,365 млрд евро).

С 2016 г. в Европе рынок потребления органических продуктов растет быстрее, чем их производство. На сегодняшний момент Европа и США планируют расширять рынки, которые будут поставлять им органическую продукцию, следовательно, для российских производителей это открывает перспективы роста и развития.

В России площадь земель под органическое сельское хозяйство составляет около 385,1 тыс. га. Из бывших союзных республик Казахстан и Украина опережали Россию до 2014 г. по размеру «органических» площадей, при этом среднегодовой темп роста в России был выше, чем в этих республиках. В 2015 г. Россия обогнала Казахстан по площади под органическим сельским хозяйством, однако уступает Украине как по площади, так и по количеству производителей и переработчиков. В России в органическом производстве работают около 80 сертифицированных производителей и 37 переработчиков, украинский же рынок представлен 210 производителями и 110 переработчиками. Это пока свидетельствует об узости данного рынка, а также о недостаточном количестве поставщиков органической продукции. Данные показывают, что потребление органической продукции в России растет, и для того, чтобы привести ситуацию на рынке в порядок, необходимо увеличивать количество сертифицированных предприятий на 200 в год. В этом случае в течение 8–10 лет мы сможем приблизиться к показателям ведущих европейских стран. Однако в настоящее время прирост составляет не более 4–5 предприятий.

В свою очередь это отражается и на потреблении биопродуктов для органического АПК, т.е. их потребление также сдерживается.

В настоящее время существует ряд проблем, препятствующих процессу трансфера биотехнологий и коммерциализации созданных на их основе продуктов в сферу органического АПК. Самой главной проблемой является неактивный переход хозяйств к системе органического сельского хозяйства в принципе. Данный рынок, обладая высокой маржинальностью, в то же время достаточно ограничен, особенно на уровне отдельных регионов в связи диспаритетом регионального развития. Кроме того, переход к органическому хозяйству занимает длительный период времени, что приводит к потере дохода сельхозтоваропроизводителей, а механизм субсидирования данного перехода со стороны государства в настоящее время отсутствует.

Значимой проблемой также является отсутствие механизмов государственной поддержки использования биотехнологий в АПК, а именно субсидирования использования биотехнологических продуктов. Хозяйствам в данном случае выгоднее использовать привычные химические удобрения и средства защиты, поскольку предусмотрено соответствующее субсидирование, а биопрепараты применяются по остаточному принципу.

На стадии разработки технологии и выведения на уровень трансфера в виде патентов, ноу-хау, лицензионных соглашений, к существенным проблемам можно отнести следующие: длительность и высокая стоимость процесса разработки и верификации технологии, а также высокие затраты на организацию производства на базе индустриального партнера. Биотехнологическое производство является достаточно ресурсоемким, поскольку, во-первых, биотехнологический процесс должен быть организован в соответствии со стандартами GLP и GMP, что требует повышенного внимания к оборудованию помещений, регламентации процессов, во-вторых, высока стоимость производственного и аналитического оборудования, поскольку весь биотехнологический процесс требует непрерывного строжайшего контроля, включая современные методы с использованием, в частности, ГЖХ МС и другого оборудования.

Тем не менее, проанализировав ряд исследований трендов органического рынка, можно выделить ряд факторов, которые окажут

благоприятное воздействие на формирование спроса на биотехнологические продукты для органического АПК. Отличительной особенностью наших производителей сертифицированной органической продукции является приверженность «органической идее». Например, в странах Прибалтики многие занимаются органикой чисто с коммерческой точки зрения. Это либо получение больших дотаций, либо некий ценовой диапазон, который позволяет им продавать достаточно выгодно свою продукцию. Поэтому с этой точки зрения наш сектор производства более устойчив.

Еще одним фактором, благоприятным для развития спроса на биопродукты, для органического АПК является большой потенциал (в том числе и экспортный) развития рынка органической продукции. Так, на сегодняшний момент в России сертифицировано 290 тыс. га земли. Это 14-е место в мире по количеству сертифицированной земли и одно из первых по её приросту в 2014–2015 г., но в отличие от многих стран из этого количества не менее 30% сертифицировано под будущие проекты. Такая тенденция характерна именно для нашей страны, где земли достаточно много, в европейских странах количество сертифицированной земли практически равно количеству обрабатываемой.

В мире количество людей, постоянно потребляющих органические продукты, также за 15 лет выросло не менее чем в пять раз и составило около 700 млн чел. Основные потребители – люди с высоким или средним достатком, проживающие в благополучных, развитых странах. В 2016 г. впервые страны Европы признали, что рынок потребления органических продуктов в ЕС растет быстрее, чем их производство. На сегодняшний момент Европа и США стали считать рынки развивающихся стран как наиболее перспективные с точки зрения обеспечения потребления. Рынок России в этом смысле следует рассматривать как рынок с высоким экспортным потенциалом.

Библиографический список

Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (утв. Правительством РФ от 24 апреля 2012 г. № 1853п-П8) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70068244/>.

Кручинина В.М. Государственное регулирование рынка органической продукции в России // Вестник ВГУИТ. 2017. №2.

Официальный сайт Союза органического земледелия [Электронный ресурс]. URL: <https://soz.bio/>.

О производстве и обороте органической продукции (продукции органического производства) : проект Федерального закона [Электронный ресурс]. URL: <http://rosorganic.ru/files/zakon-september-2016.pdf>.

УДК 631.15

О.А. Высоцкая

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Формирование регионального кластера производителей и переработчиков органической продукции *

Становление рынка органических продуктов в России пока идет недостаточно высокими темпами, несмотря на значительный потенциал данного рынка. Как показывает практика, формирование интегративных структур в экономике, к которым также относятся кластеры, способствует более динамичному развитию соответствующих отраслей. В статье рассматриваются механизмы формирования в Алтайском крае регионального кластера производителей органической продукции, его возможные эффекты для экономики региона.

Ключевые слова: органическое сельское хозяйство, органическая продукция, спрос, кластер.

Перспективы развития рынка органической продукции в регионах РФ во многом обусловлены проблемами формирования спро-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект 18-410-220024.

са в данном секторе. Как показывают исследования, цена – это один из наиболее сдерживающих факторов развития органического рынка. Поэтому по прогнозам экспертов с 2018 г. необходимо перейти к поиску механизмов снижения себестоимости и цены. Ведущую роль в данном процессе играют интегративные структуры. В настоящий момент каждый производитель замкнут в своём производстве, как таковая кооперация в секторе практически отсутствует: между производителями и переработчиками, производителями и сетями, производителями и научным сообществом и т.д. Кластеры как раз и являются действенными инструментами кооперации, что, в конечном итоге, приводит к снижению издержек и себестоимости.

По данным исследований, на территории Алтайского края присутствуют все предпосылки для создания полноценных кластеров, специализирующихся на производстве и переработке сельскохозяйственной продукции и продовольствия. В Алтайском крае объективно обусловлено формирование свекло-сахарного, молочно-продуктового, мясного, свиноводческого, птицеводческого, овощеводческого, плодово-ягодного, аграрно-фармацевтического, льноводческо-текстильного кластеров (Кундиус, 2012).

Кластер в АПК подразумевает такой способ организации сельскохозяйственного производства, который основан на сочетании кооперации, интеграции и сетевого взаимодействия юридически независимых организаций – сельскохозяйственных производителей, перерабатывающих предприятий, поставщиков средств производства и предметов труда, финансово-кредитных институтов, объектов инфраструктуры, научно-исследовательских институтов, высших учебных заведений и пр. О.Ю. Воронкова (2016) использует понятие «зональный агроэкокластер» как локальное аграрное, экологически ориентированное научно-инновационное, интеграционное формирование, включающее в себя сельскохозяйственные производственные, перерабатывающие и сбытовые организации, научную и учебно-производственную базу региональных научных центров и вузов, маркетинго-аналитический, лабораторно-сертификационный, туристско-рекреационный, культурно-просветительский секторы, выставочный центр, развитую инфраструктуру логистики и хранения (Воронкова, 2016).

Мы считаем целесообразным использовать данное понятие в нашем исследовании. В отличие от традиционных кластерных структур в проекте зонального агроэкокластера предполагается создание лабораторно-сертификационного, туристско-рекреационного и эколого-культурно-просветительского секторов, а также аргументирована целесообразность проведения «зонтичной сертификации» производимой органической продукции и производственных систем агроэкокластера, что связано со спецификой органического сельского хозяйства в целом.

Применение зонального подхода к формированию агроэкокластеров обусловлено значительным различием отдельных территорий регионов по природно-климатическому потенциалу, почвенному плодородию, плотности населения, уровню развития инфраструктуры, дорожно-транспортной доступности, наличию рынков сбыта продукции, а также туристическому и рекреационному потенциалам данной местности.

Опыт других регионов РФ свидетельствует о том, что идея кластеризации органического АПК жизнеспособна и имеет стратегическую перспективу. Так, в 2016 г. создан кластер органического сельского хозяйства Юга России. По своей сути это корпорация, в которую входят 3–4 крупных инвестора (оптово-распределительный логистический центр, группа перерабатывающих заводов, розничная сеть), более 200 фермерских хозяйств на земле общей площадью более 5,8 млн га, подразделение компании по сертификации органических сельскохозяйственных продуктов. Это кластер является основным поставщиком экологических и органических продуктов в здравницы, детские сады, санаторно-курортные зоны Юга России, на его базе развивается экотуризм, который дает дополнительную рабочую силу и новый рынок сбыта, а также формирует лояльность к органическим продуктам у потенциальных покупателей. Также создана научная школа органического сельхозпроизводства, которая консультирует отечественных и зарубежных фермеров по вопросам создания органик-ферм.

В Алтайском крае формирование зональных агроэкокластеров должно вестись с учетом следующих условий:

- 1) использование потенциала уже функционирующих кластеров, в частности, кластера «Алтайбио», туристских кластеров, функционирующих в различных районах края с различными природно-климатическими и почвенно-ландшафтными условиями, с целью достижения синергии от межкластерных взаимодействий;
- 2) оценка емкости регионального и отечественного рынков органической продукции, имеющихся земельных, трудовых, производственных и рекреационных ресурсов, ориентация органического производства на экспорт с целью достижения более высокой нормы прибыли в сравнении с реализацией продукции на внутреннем рынке;
- 3) формирование системы стратегических целей, обоснование функций и требований к зональному агроэкокластеру с учетом ориентиров региональной и федеральной аграрной политики, а также стратегических приоритетов развития региона.

Основным вектором развития, основной стратегией развития агроэкокластера должна стать стратегия роста и непрерывных инноваций. Поскольку кластер сам по себе выступает в качестве корпоративной формы ведения бизнеса, эта стратегия должна иметь два иерархических уровня:

1. Уровень кластера;
2. Уровень предприятий и межфирменных взаимодействий между ними.

В качестве инструмента формирования стратегии развития предприятий в кластере предлагается использовать метод стратегических карт Д. П. Нортон и Р. С. Каплана. Ими предложен стандартный шаблон по формированию стратегии предприятия. Предприятие предлагается рассматривать по следующим составляющим:

- 1) финансовая;
- 2) клиентская;
- 3) внутренних бизнес-процессов (производственная составляющая);
- 4) обучения и развития.

В рамках кластера эти компоненты стратегических целей предприятий собираются в рамках единого центра с целью выявления основных приоритетов, взаимоувязанных целей у разных участников кластера.

Аппроксимированно к региональному агроэкокластеру представляется возможной разработать следующую карту стратегиче-

ских целей как ключевых ориентиров для участников агроэкокластера (табл. 1).

Таблица 1

Модифицированная стратегическая карта агроэкокластера

БЛОК СТРАТЕГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ РЕГИОНА			
1. Рост ВРП 2. Рост уровня жизни 3. Рост высоких технологий 4. Рост инвест. привлекат.			
БЛОК СТРАТЕГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ АГРОЭКОКЛАСТЕРА			
1. Блок – экономические, финансовые цели: • рост выручки; • снижение издержек; • повышение инвестиционной привлекательности предприятий; • рост налоговых поступлений; • бюджетная эффективность государственных средств поддержки.	2. Блок – рынки, клиенты: • расширение рынка сбыта; • выход на зарубежные рынки; • формирование блока лояльных клиентов; • повышение узнаваемости продукции компаний кластера путем формирования «зонтичного бренда», проведения масштабной кампании по продвижению органической продукции.	3. Блок – цели производства: • разработка инноваций; • возможности кооперации; • улучшение контроля качества продукции; • модернизация производственных мощностей.	4. Блок – цели кадровой политики: • создание новых рабочих мест; • повышение качества персонала; • привлечение кадров высшей квалификации и препятствие их оттоку.

Безусловно, стратегические цели должны быть направлены на достижение определенных индикаторов развития. Стратегическое развитие предприятий агроэкокластера должно происходить, по нашему мнению, под четким руководством управляющего центра кластера. С целью наиболее эффективного мониторинга достижения стратегических целей предлагается система индикаторов, которая не претендует на полноту и исчерпываемость, однако может служить вектором развития основных стратегических направлений деятельности предприятий в рамках агроэкокластера (табл. 2).

Таблица 2

Матрица целевых индикаторов
для мониторинга достижения стратегических целей предприятий
агроэкокластера

МАТРИЦА ЦЕЛЕВЫХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СТРАТЕГИИ ПРЕДПРИЯТИЯ			
1. Блок – экономические, финансовые цели: • выручка от продаж основных/сопутствующих продуктов (млн руб.); • Объемы издержек производства (млн руб.) • количество привлеченных инвестиций (млн руб.) российских/иностранных (соотношение, %) • суммы полученной государственной поддержки (млн руб.) • отчисления в бюджет и внебюджетные фонды (руб.) • отчисления в бюджет и внебюджетные фонды со средств государственной поддержки (руб.)	2. Блок – рынки, клиенты: • темпы роста/снижения охвата рынка (внутренний/международный), %; • количество постоянных клиентов от общего числа клиентов, ед.; • затраты на маркетинг/результаты, руб.	3. Блок – цели производства: • стоимость НИОКР, руб.; • стоимость нового оборудования, руб.; • коэффициент обновления основных фондов, %; • стоимость оборудования, созданного силами участников кластера, руб.; • количество проектов, созданных в кооперации с участниками кластера, а также внешними участниками (ед., руб.); • затраты на системы контроля качества, руб.	4. Блок – цели кадровой политики: • затраты на обучение персонала; • рост/снижение темпа роста зарплаты разным категориям работников, %; • средняя заработная плата по категориям работников (руб.); • количество вновь прибывших высококвалифицированных специалистов (ед.); • коэффициент текучести кадров, %.

Безусловно, эта матрица может быть дополнена, модифицирована, однако она задает необходимый ориентир не только руководителям предприятий кластера, но и руководству кластера как структуры, напрямую заинтересованной в устойчивом экономическом росте региона.

Таким образом, использование модифицированных стратегических карт и разработанных автором ключевых индикаторов деятельности предприятий в агроэкокластере позволит унифицировать стратегическое видение участников кластера, более глубоко осознать их место в кластере, позволит обнаружить «узкие места» в управлении этими предприятиями.

Деятельность зональных агроэкокластеров может способствовать достижению положительных эффектов для региональной экономики: повышение конкурентоспособности региональных производителей органической продукции за счет снижения издержек в результате кооперации, повышение спроса на органическую продукцию на внутреннем рынке и рост производства органической продукции для экспорта, полное и экологически сбалансированное использование земельных ресурсов, развитие инновационных аграрных технологий, повышение уровня занятости сельского населения, активизации агроэкотуристической сферы, рост налоговых поступлений в бюджеты разных уровней, повышение устойчивости сельскохозяйственных и перерабатывающих предприятий и инновационной активности региона.

Библиографический список

- Воронкова О.Ю. Ресурсный потенциал производства органической продукции в формате зональных агроэкокластеров // Экономическое развитие региона: управление, инновации, подготовка кадров. 2016. №3. С.104–109.
- Кундиус В.А. Формирование кластеров в сельских территориях как фактор инновационного развития региональной экономики // Аграрная наука – сельскому хозяйству: материалы VII Международной научно-практической конференции. Барнаул, 2012. С. 233–238.
- Официальный сайт Союза органического земледелия [Электронный ресурс]. URL: <https://soz.bio/>

О производстве и обороте органической продукции (продукции органического производства) : проект Федерального закона [Электронный ресурс]. URL: <http://rosorganic.ru/files/zakon-september-2016.pdf>

УДК 579.64

А.В. Гребеницкова, А. Н. Иркитова

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Сравнение антагонистической активности коллекционных и ризосферных штаммов *Bacillus subtilis*

Представлены результаты сравнения антагонистической активности коллекционных и ризосферных штаммов сенной палочки в отношении *Escherichia coli*. Антимикробная активность *Bacillus subtilis* проверялась диффузионными методами (перпендикулярных штрихов, блоков и лунок) и путем тестирования штаммов-антагонистов и их супернатантов при совместном культивировании в жидкой питательной среде с тест-штаммом кишечной палочки. Коллекционные штаммы *B. subtilis* лучше проявили себя в диффузионных методах определения антагонистического действия (наилучший результат у штамма 11), а ризосферные штаммы под номерами 15, 16 и их супернатанты – при совместной инкубации с тест-культурой на жидкой питательной среде. Поэтому для создания микробных биопрепаратов с широким спектром антагонистического действия рекомендовано составление бактериального консорциума из всех изученных штаммов сенной палочки.

Ключевые слова: антагонистическая активность, *Bacillus subtilis*, биопрепараты, *Escherichia coli*.

Введение. *Bacillus subtilis* является одним из наиболее изученных видов бактерий ввиду повсеместного распространения. Ряд свойств данного микроорганизма, таких как неприхотливость к условиям культивирования, высокая биологическая активность и способность к спорообразованию, делают его перспективным объектом для применения в различных отраслях промышленности (Лазовская, 2013). Наиболее часто *B. subtilis* используется для производства нуклеотидов, продаваемых в качестве усилителей пищевого вкуса, аминокислот (таких как триптофан, гистидин и фенилаланин) и витаминов, таких как биотин, фолиевая кислота и рибофлавин (Baruzzi, 2011).

Широко распространено применение сенной палочки и в сельском хозяйстве в составе разнообразных биопрепаратов, таких как пробиотики для животных, средства защиты растений, микробные удобрения и пр. Это обусловлено тем, что *B. subtilis* обладает антагонистической активностью в отношении разнообразных патогенных микроорганизмов (бактерий, грибов и вирусов) за счет большого пула синтезируемых антибиотических соединений (Stein, 2005).

Для разработки бактериальных препаратов необходимо производить отбор микроорганизмов, чтобы выявить наиболее сильные штаммы по заданному критерию. В рамках данного исследования мы были заинтересованы в отборе наиболее сильных штаммов-антагонистов, эффективных против *E. coli*, так как эшерихиоз – одна из первых по распространенности болезней молодняка всех видов сельскохозяйственных животных (Сусский, 2012).

Известно, что дикие, свежевыделенные штаммы микроорганизмов, обладают высокой биологической активностью. Кроме того, такие бактерии лучше адаптированы к условиям агрессивной природной среды, нежели коллекционные штаммы микробов, поэтому особый интерес вызывают ризосферные штаммы сенной палочки, которые должны быть сильными антагонистами (Иркитова, 2011).

Цель работы – сравнить антагонистическую активность коллекционных и ризосферных штаммов *B. subtilis* по отношению к *E. coli*.

Задачи:

1. Изучить антагонистическую активность коллекционных и ризосферных штаммов сенной палочки в отношении кишечной палочки диффузионными методами определения антимикробного действия.

2. Сравнить антагонистические эффекты при совместном культивировании коллекционных и ризосферных штаммов *B. subtilis* и их культуральных жидкостей с *E. coli* в жидкой питательной среде.
3. Отобрать штаммы сенной палочки для включения в состав будущего биопрепарата.

Материалы и методы исследований. Объектами исследования являются два штамма *B. subtilis*, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), и два штамма *B. subtilis*, выделенные из ризосферы растений (табл. 1).

Таблица 1

Штаммы микроорганизмов,
использованные для проведения исследования

№ штамма	Источник выделения штамма
11	ВКПМ: В-1323
12	ВКПМ: В-2895
15	Ризосфера подсолнечника
16	Ризосфера цикория

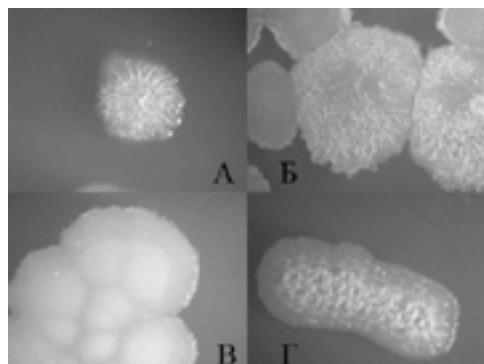
В качестве тест-культуры использовали штамм *E. coli*, выделенный из продуктов жизнедеятельности куриц с птицефабрики.

В качестве питательной среды для *B. subtilis* и *E. coli* использовалась Л-среда (см. рис.) (г/л): дрожжевой экстракт – 5,0, пептон – 15,0, NaCl – 5,0, агар – 15,0, вода дистиллированная – 1,0 л. Для приготовления жидкого Л-бульона применялся этот же рецепт, только без добавления агара. Для культивирования кишечной палочки также использовалась среда Эндо (г/л): 37 г сухой среды вносят в 1,0 л холодной дистиллированной воды.

Антагонистическую активность исследуемых штаммов в отношении *E. coli* проверяли диффузионными методами (перпендикулярных штрихов, блоков и лунок) на твердой питательной среде. О присутствии антибактериального эффекта можно говорить при наличии зон ингибирования роста культуры *E. coli* в опытных чашках Петри (Иркитова, 2012).

Также антимикробное действие сенной палочки в отношении кишечной палочки проверяли при совместном культивировании

на жидкой питательной среде штаммов *B. subtilis* (или их супернатантов) с *E. coli*. Чтобы получить бесклеточную культуральную жидкость бактерий, их биомассу 20 минут центрифугировали при 5 тыс. оборотов в минуту.



Внешний вид колоний исследуемых штаммов *B. subtilis* на *L*-среде: А – 11-й штамм; Б – 12-й штамм; В – 15-й штамм; Г – 16-й штамм

Учет результатов проводили по индексу блокирования роста (ИБР), который определяли путем вычисления отношения числа колоний *E. coli*, выросших на среде Эндо после совместного культивирования со штаммами-антагонистами или их супернатантами, к числу колоний, выросших на контрольной среде без бактерий *B. subtilis* или их метаболитов. О присутствии антагонистического эффекта можно говорить при ИБР <1 (Гребенщикова, 2018).

Результаты и их обсуждение. Согласно полученным результатам по диффузионным методам определения антагонистической активности все исследуемые штаммы *B. subtilis* проявили антибактериальный эффект в отношении

E. coli. Однако во всех методах антагонизм удалось зафиксировать лишь для штамма 12. Тем не менее наилучшие результаты по протяженности зоны угнетения роста кишечной палочки отмечались у штамма 11 (см. табл. 2). Эксперимент проводили в двух (метод перпендикулярных штрихов) и трех повторностях (методы блоков и лунок), для каждого штамма посчитано среднее арифметическое значение и ошибка среднего ($M \pm m$).

Таблица 2

Антагонистическая активность *B. subtilis*
в отношении *E. coli* при применении диффузионных методов

№ штамма	Зона угнетения роста, мм ($M \pm m$)		
	Метод перпендикулярных штрихов	Метод лунок	Метод блоков
11	0	9,3 $\pm$ 0,58	8,3 $\pm$ 0,58
12	2,00 $\pm$ 0,41	4,0 $\pm$ 1,00	3,7 $\pm$ 1,15
15	0	6,7 $\pm$ 0,58	7,3 $\pm$ 1,53
16	0	5,3 $\pm$ 0,58	7,3 $\pm$ 2,52

Несмотря на то, что коллекционные штаммы были выделены давно и не один год находились в лабораторных условиях, они проявили значительный антибактериальный эффект против агрессивного штамма тест-культуры. Ризосферные штаммы тоже показали отличные результаты, пусть и несколько ниже чем 11-й коллекционный штамм. Это можно объяснить тем, что синтезируемые штаммами 15 и 16 антибиотические соединения оказались менее эффективны против данного штамма *E. coli*.

Однако стоит учитывать, что бациллы могут синтезировать не только низкомолекулярные антимикробные соединения, способные диффундировать в твердой питательной среде, но и высокомолекулярные антибиотики, которые из-за большой молекулярной массы могут распространяться лишь в жидкой питательной среде. Вот почему для получения наиболее полных сведений об антагонистической активности исследуемых штаммов *B. subtilis* были использованы и другие методы по ее оценке.

При совместном культивировании в жидкой питательной среде *B. subtilis* или ее супернатанта с *E. coli*, хотя и в разной степени, но все штаммы-антагонисты (и их культуральные жидкости) проявили свою противомикробную активность в отношении кишечной палочки (см. табл. 3).

Таблица 3

Антагонистическая активность
исследуемых штаммов по отношению к *E. coli*
при совместном культивировании в жидкой питательной среде

№ штам-ма	Со штаммами-антагонистами				С супернатантами штаммов-антагонистов			
	ИБР через 2 дня	ИБР через 2 не-дели	ИБР через 3 не-дели	ИБР через 4 не-дели	ИБР через 2 дня	ИБР через 2 не-дели	ИБР через 3 не-дели	ИБР через 4 не-дели
11	1,75	0,69	0,43	нд	1,73	0,07	0	0,095
12	1,74	0	0,43	0,05	0,42	0,01	14,28	нд
15	0,89	0,06	0,05	0,045	1,50	0,03	0	нд
16	6,2	0	0	0,05	0,46	0	0	0,015

Примечание: нд – нет данных

Согласно изложенным выше данным наивысшую антагонистическую активность проявляют природные штаммы сенной палочки 15 и 16, а также их культуральные жидкости. Как для коллекционных, так и для ризосферных штаммов можно проследить закономерность – через два дня антагонистическая активность всех штаммов слабая (это можно объяснить тем, что антибиотические вещества еще не накопились в среде культивирования), ИБР через 2-3 недели достигает своего наименьшего значения (т.е. наилучшего результата), а через 4 недели, как правило, начинает увеличиваться, т.е. антагонистическая активность исследуемых штаммов сенной палочки ослабевает или утрачивается совсем. Такие результаты показывают, что в течение двух-трех недель *B. subtilis* активно выделяют в среду вещества, угнетающие рост *E.coli*, борется с ней за питательный субстрат, а к 4-й неделе из-за недостатка кислорода сенная палочка задыхается и перестают оказывать действие на кишечную палочку. По микроскопии видно, что большая часть клеток *B. subtilis* уже через неделю образуют споры, но, видимо, накопленные в среде антибиотические вещества еще некоторое время продолжают действовать на *E.coli*.

Однако у штамма 12 *B. subtilis* наблюдается другая тенденция – при повышении ИБР к 3-й неделе культивирования с *E. coli* еще через

неделю отмечается улучшение показателя блокирования роста. Это можно объяснить тем, что данный штамм способен синтезировать эффективный в отношении кишечной палочки антибиотик даже в состоянии эндоспор, в которые *B. subtilis* «выпадает» при длительной инкубации из-за снижения концентрации кислорода в питательной среде.

Среди изучаемых штаммов сенной палочки не оказалось таких, которые бы не были антагонистически активны в отношении *E. coli*, поэтому каждый из них может быть рекомендован для включения в состав биологического препарата в виде действующего компонента. Однако коллекционные штаммы в большей степени проявили себя как продуценты низкомолекулярных антимикробных соединений, а ризосферные – высокомолекулярных. Кроме того, согласно полученным результатам по жидким питательным средам все штаммы достигают пика своей антагонистической активности в разное время, вот почему следует создавать многокомпонентные бактериальные биопрепараты, которые будут обладать высокой антимикробной активностью на протяжении всего периода использования.

Выводы

1. Антагонистической активностью в отношении кишечной палочки согласно диффузионным методам ее определения обладают все ризосферные и коллекционные штаммы *B. subtilis*. Наилучший результат показал 11-й лабораторный штамм сенной палочки.
2. При тестировании антибактериального действия штаммов *B. subtilis* (и их супернатантов) против *E. coli* в жидкой питательной среде все штаммы-антагонисты в динамике проявили себя. Ризосферные штаммы и их культуральные жидкости показали наилучшие результаты.
3. Наиболее оптимальным вариантом для выбора действующего компонента будущего бактериального препарата является составление консорциума из всех исследованных штаммов *B. subtilis*.

Библиографический список

Гребенщикова А. В., Иркитова А.Н. Оценка антагонистической активности некоторых штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для

использования в сельском хозяйстве // Научные инновации – аграрному производству : материалы Междунар. науч.-практич. конф., посвящ. 100-летию юбилею Омского ГАУ (21 февраля 2018 г.) / под ред. А.А. Гайвас. Омск, 2018. С. 1227–1231.

Ирkitова А. Н., Каган Я. Р., Соколова Г. Г. Антагонистическая активность молочных культур *Lactobacillus acidophilus* по отношению к тест-штаммам *Escherichia coli* // Известия Алтайского гос. ун-та. 2011. № 3/2. С. 19–21.

Ирkitова А.Н., Каган Я.Р. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // Известия Алтайского гос. ун-та. 2012. № 3. С. 41–44.

Лазовская А. Л., Воробьева З. Г. и др. Споровые пробиотики в сельском хозяйстве // Успехи современной биологии. 2013. Т. 133. № 2. С. 133–140.

Сусский Е.В., Пирожков М. К. Оптимизация и стандартизация условий производства антиадгезивной антиоксической сыворотки против эшерихиоза сельскохозяйственных животных // Вестник Ульяновской гос. сельскохозяйственной академии. 2012. № 1. С. 60–64.

Baruzzi F, Quintieri L., Morea M., Caputo L. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food // Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advance. 2011. Vol. 2. P. 1102–1111.

Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Mol. Microbiol. 2005. Vol. 56. N 4. P. 845–857.

УДК 632.937

С.А. Доброхотов, А.И. Анисимов

*Санкт-Петербургский государственный аграрный университет
(Санкт-Петербург, Россия)*

Использование биологических средств защиты растений в органическом земледелии

Представлены результаты оценки эффективности использования биологических средств защиты растений на картофеле, зерновых, овощных и ягодных культурах в условиях Северо-Западной зоны России (Ленинградская область).

Ключевые слова: органическое земледелие, биологические средства защиты, картофель, зерновые культуры, овощные культуры, ягодные культуры.

В 2010–2018 гг. изучали эффективность биологических средств защиты растений (БСЗР) на зерновых, овощных культурах и картофеле, а также на ягодных культурах в условиях Северо-Западной зоны России (Ленинградская область). Опыты проводили на участке органического земледелия (ОЗ) в учебно-опытном саду СПбГАУ, в хозяйствах Ленинградской области, ЛПХ, садоводческих участках. Определяли биологическую эффективность (БЭ), а в некоторых случаях и экономическую эффективность применения БСЗР.

В условиях Ленинградской области, по данным филиала Россельхозцентра (РСХЦ), экономически значимыми являются 14 вредителей и болезней растений, хотя фитомониторинг ведётся в отношении значительно большего числа вредных объектов, которые могут стать потенциально опасными.

Зерновые культуры. В некоторых областях северо-запада на зерновых культурах может вредить заселяющая всходы шведская муха, личинки которой поражают стебли растений. Ранние посевы зерновых и поздние озимых чаще всего «уходят» от повреждений мухой. В традиционном земледелии при превышении численности

мух в пробах (кошение сачком) рекомендуют при проведении химпрополки добавлять в рабочую жидкость гербицидов разрешённые инсектициды. В наших опытах проведения борьбы со «шведкой» и злаковыми тлями не требовалось. В любом случае необходимо наблюдение за динамикой развития злаковых тлей, обнаружения заселения полей энтомофагами (божьи коровки, златоглазки, сирфиды, галлицы и др.), определения соотношения хищника и жертвы, чтобы при возможности не проводить химических обработок.

В связи со строгим севооборотом на участке ОЗ в СПбГАУ развитие корневых гнилей зерновых культур было очень слабое (1–2 %), отсутствовала мучнистая роса. Необходимо было проводить борьбу с гельминтоспориозами. По этим заболеваниям в Ленинградской области, несмотря на ежегодное протравливание семян химическими препаратами, наблюдаются высокая степень поражения растений в конце вегетации растений и, соответственно, заражение семян возбудителями грибной инфекции: на ячмене – сетчатой пятнистостью, овсе – красно-бурой пятнистостью. В ОЗ применение синтетических химических СЗР не разрешается. Можно использовать микробиологические препараты, микроэлементы, термическое обеззараживание семян перед посевом. На сорте овса Яков наблюдали развитие корончатой ржавчины, на овсе сорта Скакун – пыльной головни, которую занесли с покупным посевным материалом в 2015 г. Развитие других заболеваний не имело существенного значения.

Нами установлено, что в условиях слабого развития болезней (пятнистостей) БЭ некоторых биопрепаратов была достаточной, достигая 70–80 % в 2015 г. Однако при неблагоприятных погодных условиях 2016 г., приведших к развитию эпифитотии, эффективность биопрепаратов была слабой. В борьбе с пыльной головней овса «не сработал» и Фитоспорин, ПС, хотя в 2015 г. наблюдали его высокую эффективность. Поэтому в 2016–2017 гг. изучали эффективность термического обеззараживания семян и обработки их микроэлементами. Наибольшая эффективность на участке ОЗ в СПбГАУ достигалась при обеззараживании семян тёплым воздухом при температуре 53 °C в течение 7–10 минут, при толщине слоя овса 1,5 см и обработкой их перед посевом раствором Фитоспорина в концентрации 2,5–5%. БЭ достигала 92%.

Из 8 изученных микроэлементов (микроудобрений) эффективными оказались следующие вещества: молибдат аммония, хелат железа, хелат меди, медный купорос в концентрации 0,1–0,2 % (0,1–0,2 кг/т). При внесении комплексных минеральных удобрений (Азофоска, из расчёта по 50 кг д.в. /га каждого элемента) эффективность термического обеззараживания и обработки семян микроэлементами повышалась значительно. Это свойство комплексных минеральных удобрений в условиях традиционного земледелия способствует, конечно, повышению эффективности предпосевной обработки семян в борьбе с пыльной головней. В органическом земледелии азот в минеральной форме применять нельзя, поэтому приходится искать замену Азофоски. Необходимо отметить, что проведение биоборьбы и термического обеззараживания привело к снижению поражённости семян овса с 5% (2015 г.) до 0,1 % (2017 г.).

Белокочанная капуста. На протяжении 8 из 9 лет отметили сильную вредоносность крестоцветных блошек, а в 2017 г. – только весенней капустной мухи (на новом участке). В борьбе с крестоцветными блошками разрешённых (зарегистрированных) препаратов не было. Поэтому использовали опытные образцы Бацикола из ВНИИСХМ, Немабакта из ВИЗРа. В течение периода вегетации, в зависимости от численности вредителя, пришлось проводить от одной до трех обработок биопрепаратами. БЭ Бацикола составляла от 50 до 70%, Немабакта – 40–50 % (при двукратном применении). Установлена эффективность биохимического препарата Фитоверма, применяемого в концентрации 0,8–1 % (3,2–4,0 л/га). Необходимо включить изученные препараты в план государственных испытаний для применения на капусте против крестоцветных блошек. Опрыскивание 0,4 % Фитовермом против капустной моли (официально разрешено) вызывало в наших опытах гибель крестоцветной блошки в пределах 30–50 %. Поэтому концентрацию рабочего раствора повышали до 1%. Против гусениц капустной моли и белянок обычно применяли биопрепараты – Битоксибациллин, Лепидоцид в рекомендуемых концентрациях (1 %), проводя однократную обработку против каждого вида вредителя. Природные энтомофаги (апантелес и др.) повышали БЭ в борьбе с белянками до 100%. В борьбе с капустными мухами ранее установлена высокая БЭ внесения Немабакта в кассеты, ещё в теплицах

за один-два дня до высадки рассады в поле. Запоздывание с проведением обработки по отрождающимся личинкам мухи сильно снижало эффективность биопрепаратов на основе энтомопатогенных нематод, приводило к «выпадам» растений.

Морковь. В условиях северо-запада РФ морковь может сильно страдать от повреждений морковной листоблошки. В борьбе с этим вредителем испытаны опытные образцы биологических препаратов (Бацикол, Актинин) производства ВНИИСХМ. Аналог Бацикола препарат Бацитурин официально зарегистрирован в Беларуси в борьбе с этим вредителем. Наибольшая БЭ отмечалась при двукратной обработке моркови биохимическим препаратом Фитовермом в концентрации 0,8–1,0%. Необходимо включить препарат в план государственных испытаний для дальнейшей регистрации его на моркови. Поражения болезнями в период вегетации, кроме 2016 г., когда весь участок залило водой, не отмечали. Практикуется закладка на зимнее хранение здоровых корнеплодов.

Столовая свёкла. Во многих регионах России может сильно вредить свекловичная минирующая муха, заселяющая появляющиеся всходы, особенно первое поколение. Второе поколение менее вредоносно, так как растения становятся уже окрепшими. В условиях органического земледелия СПбГАУ и в неспециализированных хозяйствах Ленинградской области проведения борьбы со свекловичной мухой не требовалось. В традиционном земледелии (опыты в АО «Детскосельский») в 2011 г. в борьбе против второго поколения эффективность Фитоверма достигала 60% при опрыскивании препаратом в концентрации 0,8–1,0%. В случае появления церкоспороза проводят обработки биопрепаратами – Ризопланом, Фитоспорином и другими. В ОЗ разрешено применять для борьбы с этим заболеванием бордоскую смесь, обработки помогли искоренить листовые болезни в эпифитотийном 2016 г.

Картофель. На садоводческих участках в 2006, 2011 гг. отметили заселение картофеля колорадским жуком. Против личинок 1-го возраста применяли микробиологические средства – Битоксибациллин, П в концентрации 1 % (5 кг/га) и Бацикол, Ж в концентрации 5 % (25 л/га). БЭ достигала 100%, личинок старших возрастов на картофеле не наблюдали. В эталонном варианте, при применении хими-

ческого препарата Арриво, БЭ также составила 100 %. Сложнее бороться с личинками жуков-щелкунов – проволочниками. Испытан биологический препараты Немабакт (50 млн инвазионных личинок/сотку) при обработке дна борозды перед посадкой картофеля и проливе вегетирующих растений рабочим раствором в фазу бутонизации-цветения. При двукратной обработке удавалось снизить повреждённость клубней ниже 5 %.

Установлена биологическая эффективность опытного образца грибного препарата Метаризина, в последующем он был включён в государственный каталог пестицидов и агрохимикатов для применения на некоторых культурах.

В эпифитотийные годы приходится бороться с опасной болезнью картофеля на северо-западе РФ – фитофторой. В наших опытах двукратное опрыскивание посадок Бордоской смесью в июле и двукратной обработке биопрепаратами (Бактофит, Фитоспорин, Ризоплан и др.) в начале августа позволило задержать развитие болезни на срок до двух недель.

Ягодные культуры. Чёрная смородина. В условиях северо-запада многие ценные сорта страдают от повреждения почковым клещом. Двукратная обработка растений Фитовермом после цветения, когда вредитель из разрушающихся старых почек переходит на листья, помогает, но не даёт 100% БЭ. Поэтому в момент образования новых почек в июле-августе вредитель проникает в них, в сентябре популяция успевает восстановиться почти до прежнего уровня. Опрыскивание «сильными» химическими препаратами (Актара, Конфидор) в эпизоотийном по почковому клещу 2018 г. на сортах Ядренная и других, не смогли «достать» четырехногого вредителя в почках. Радикальным способом борьбы является искоренение старых посадок на срок до одного года, приобретение чистосортного посадочного материала из питомников с повышенной устойчивостью к клещу.

Малина. В условиях северо-запада обычная малина может сильно повреждаться малинной мухой, стеблевой галлицей, клещами, в некоторые годы – личинками малинного жука. Долгоносиком повреждается обычно незначительно. В борьбе с малинной мухой, стеблевой галлицей, листовыми клещами радикальным способом борьбы оказалось искоренение старых посадок малины на один год и закладка посадок

здоровым материалом. Однако со временем заселение посадок вредителями всё-же происходит. Против клещей помогали микробиологические препараты (Бацикол и Битоксибациллин) и Фитоверм. Ремонтная малина, в связи с тем, что надземная часть её срезается осенью, менее страдает от вредителей, однако в 2018 г. отмечали повреждение отрастающих стеблей малинной мухой. Плодоношение от побегов возобновления приходится на поздний срок (август-октябрь), когда погодные условия северо-запада РФ становятся уже неблагоприятными для развития ягод (поражаются серой гнилью). Поэтому урожайность этой культуры у нас обычно ниже, чем на юге.

Земляника. Испытаны различные биопрепараты в борьбе с вредителями (землянично-малинный долгоносик, земляничный прозрачный клещ, паутинный клещ). Наибольшее экономическое значение имеет долгоносик-цветоед. Против него наибольшую БЭ имеет биопрепарат Бацикол и биохимический – Фитоверм. При двух-трехкратной обработке БЭ достигает 60–70 %, поврежденность бутонов снижается в два-три раза. Эффективность однократной обработки химическими препаратами (Алатар и др.) обычно выше. В связи с биологическими особенностями вредителя в силу растянутой миграции из необрабатываемых посадок малины, участков земляники и других мест часть препарата не попадает на долгоносика, он успевает отложить яйцо в бутон и надкусить цветоножку. Поэтому даже при химических обработках наблюдаются поникшие, завядающие, а позже опадающие бутоны. БЭ по проценту гибели жуков при обработках, из-за трудностей обнаружения долгоносиков при учётах, обычно не определяется.

Против земляничного прозрачного и паутинного клещей установлена высокая БЭ при повышенных концентрациях рабочего раствора Битоксибациллина (2–3 %), особенно в условиях теплиц. В садоводческих участках, где применяли биопрепараты (БТБ, Бацикол, Немабакт), отметили высокую эффективность природных популяций хищных клещей-фитосейд и др. В ЗАО «Тайцы», где с вредителями земляники проводилась только химическая борьба, природных популяций хищных клещей не обнаруживали. Поэтому проводили выпуски размноженных в биолaborатории клещей из рода Амблисейс (спустя 10–14 дней после опрыскивания химпрепаратами).

В борьбе с серой гнилью наибольшую БЭ показало двукратное профилактическое опрыскивание отрастающей земляники в мае бордоской смесью. В конце мая, при благоприятных погодных условиях, рекомендуем использовать биопрепараты. Обработки от вредителей можно совмещать с опрыскиванием биофунгицидами.

УДК 581.165

**М.А. Заугольникова¹, И.Д. Бородулина¹, О.В. Бычкова¹,
Т.В. Плаксина²**

¹Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

²Научно-исследовательский институт садоводства Сибири
им. М.А. Лисавенко (Барнаул, Россия)

Методы биотехнологии в размножении ягодных культур

Представлены данные по клональному микроразмножению ремонтантных сортов земляники садовой. Изучен рост и развитие регенерантов на этапе собственно микроразмножения. Выявлена сортоспецифичность коэффициента размножения при использовании разных концентраций 6-бензиламинопурина.

Ключевые слова: клональное микроразмножение, регенерант, земляника садовая, сорт, 6-бензиламинопурин.

Введение. В настоящее время в научной литературе имеется большое количество сведений, касающихся усовершенствования методов клонального микроразмножения разных культур, включая и плодово-ягодные (Митрофанова, 2009), а наиболее разработанные технологии уже широко используются при массовом производстве посадочного материала. В условиях Западно-Сибирского региона использование методов биотехнологии для размножения растений

весьма актуально, так как традиционным способом это возможно всего три летних месяца.

Земляника садовая – широко востребованная ягодная культура. Появление на рынке ремонтантных сортов значительно расширяет период потребления ягод в свежем виде, что немаловажно для Сибири. Технологии микроразмножения для данной культуры уже существуют (Леонова, 2013; Князева, 2016; Панкратова, Бураменская, Прокопенко, 2017), но авторы неоднократно отмечают необходимость их оптимизации для каждого сорта.

Материалы и методы. Исследования проводились в Алтайском центре прикладной биотехнологии Алтайского государственного университета. В качестве объектов исследований были использованы растения земляники садовой *Fragaria* × *Ananassa* Duch. двух ремонтантных сортов «Mara de Bois» и «Merlan» из коллекции *in vitro* Алтайского центра прикладной биотехнологии.

В работе использованы классические биотехнологические приемы для микроразмножения растений (Бутенко, 1999). Культивирование регенерантов осуществляли на минеральной основе питательной среды Мурасиге-Скуга, дополненной агаром, сахарозой и регулятором роста 6-бензиламинопурином (БАП). Контролем служила среда без регулятора. Условия культивирования: освещенность – 3000 лк, температура +25 °С, фотопериод 16/8 ч (свет/темнота). В экспериментах оценивали коэффициент размножения (КР) генотипов, интенсивность роста и развития. Обработка полученных данных была осуществлена при помощи *Microsoft Office Excel* 2016.

Результаты. При подборе питательной среды на этапе микроразмножения большинство исследователей выбирают среду МС, содержащую наибольшее количество неорганического азота, а также обращают внимание на индивидуальные потребности каждого сорта растений (Леонова, 2013; Князева 2016). На этапе собственно микроразмножения протестировали 6 вариантов питательной среды (по прописи Мурасиге-Скуга, дополненных 2–6 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП).

Наибольший коэффициент размножения (превышающий контроль в 14–17 раз) наблюдали у земляники «Mara de Bois» (см. рис. 1) при концентрации БАП, равной 3 мкМ (КР = 17,0±1,8). У «Merlan» –

при более высокой концентрации – 5 мкМ ($KP = 14,2 \pm 1,5$) (см. рис. 1, 2). У этого сорта коэффициент размножения увеличивался с повышением концентрации цитокинина в среде. Вариант с 3 мкМ БАП оказался самым неэффективным для данного сорта ($KP = 9,1 \pm 1,1$).

Для земляники «Mara de Bois», наоборот, самыми оптимальными для пролиферации оказались среды с меньшей концентрацией цитокинина (2 и 3 мкМ), с увеличением концентрации БАП в среде коэффициент размножения снижался. Каллус в контрольной среде отсутствовал. С увеличением содержания регулятора роста в питательной среде количество каллуса заметно возрастало. Наибольшее количество его наблюдалось в средах с концентрацией БАП, равной 5 и 6 мкМ.

От высоты микророзеток зависит удобство работы с растениями и их развитие на следующем этапе укоренения. Наибольшая высота микророзеток отмечена в контроле (рис. 3), так как здесь наблюдалось апикальное доминирование при отсутствии цитокинина в питательной среде. Высота контрольных микророзеток «Mara de Bois» и «Merlan» составляла 3,9 и 4,2 см соответственно.

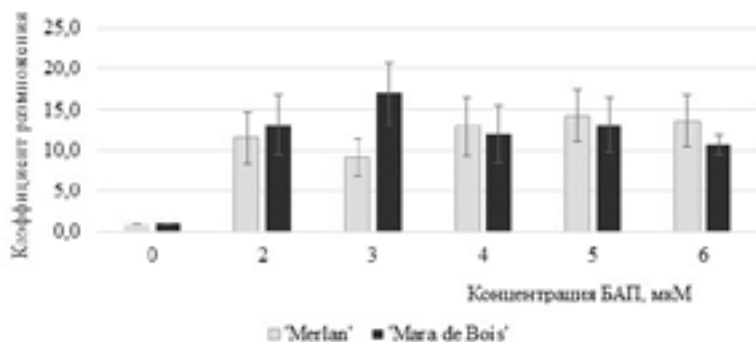


Рис. 1. Влияние концентрации 6-бензиламинопурина (БАП) на микроразмножение ремонтантных сортов земляники садовой ($n = 12-18$)

Самые низкие регенеранты обоих сортов наблюдались в вариантах со средней и повышенной концентрацией цитокинина, равной 3, 4 и 5 мкМ. Так, «Merlan» на данных средах имел мериклоны

высотой 2,4 см, а у «Mara de Bois» они варьировали в пределах 2,4–2,7 см. Сравнительная характеристика сортов показала, что «Mara de Bois» в большинстве вариантов имела более высокие микророзетки по сравнению с «Merlan», за исключением контроля.

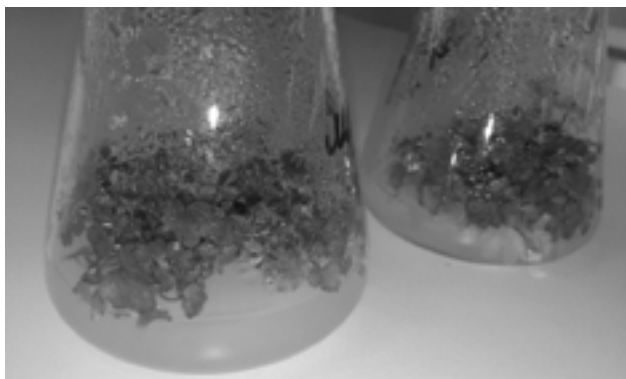


Рис. 2. Земляника сорта «Merlan» на этапе собственно микроразмножения

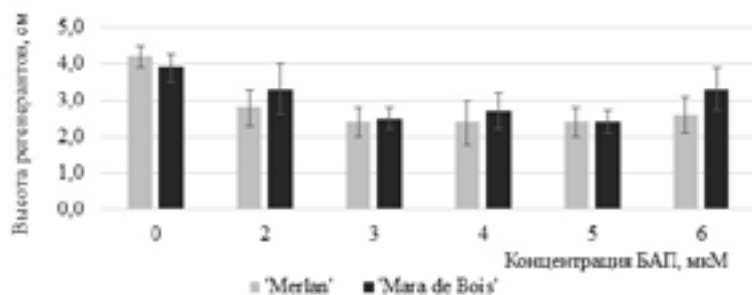


Рис. 3. Влияние концентрации 6-бензиламинопурина (БАП) на высоту розеток ремонтантных сортов земляники садовой

Облиственность регенерантов во всех вариантах, исключая контроль, была высокой: количество листьев варьировало от 25 до 45 шт./мериклон. Причем для «Mara de Bois» отмечена параболическая зависимость количества листьев от содержания цитокинина в питательной среде, т.е. с увеличением концентрации до 3 мкМ ко-

личество листьев возрастало с 36 до 45 шт., с дальнейшим увеличением регулятора роста до 4–6 мкМ облиственность мериклонов снижалась до 33–38 шт.

Выводы. Таким образом, при изучении влияния цитокинина на коэффициент размножения сортов было отмечено, что при относительно низких концентрациях БАП доминировала земляника «Mara de Bois», при более высоких – «Merlan». При концентрации БАП 2, 5 и 6 мкМ регенеранты «Merlan» были более облиственными. При среднем значении цитокинина (3 и 4 мкМ) по этому показателю лидировала «Mara de Bois».

Библиографический список

- Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М., 1999. 160 с.
- Князева И.В. Клональное микроразмножение сортов земляники садовой // Вестник научных конференций. 2016. № 2-6 (6). С. 52–53.
- Леонова Н.В. Оптимизация состава питательной среды при размножении земляники садовой *in vitro* // Вестник Брянской сельскохозяйственной академии. 2013. № 1. С. 45–48.
- Панкратова А.А., Бураменская М.В., Прокопенко Т. Оценка влияния регуляторов роста различной природы на морфогенез и коэффициент размножения растений земляники садовой в процессе клонального микроразмножения // Труды Костромской государственной сельскохозяйственной академии. 2017. С. 12–18.

УДК: 637.12 :639 (571.150-25)

Е.М. Зуева, Н.И. Владимиров

*Алтайский государственный аграрный университет
(Барнаул, Россия)*

Некоторые показатели состава молока коз разных пород пригородной зоны Барнаула

Изучены качественные показатели молока коз, изученные в Алтайском крае для характеристики их технологических свойств от коз зааненской, чешской и горьковской пород.

Ключевые слова: коза, порода, молоко, жир, белок, сухой обезжиренный молочный остаток (СОМО), плотность, кислотность, Алтайский край.

В настоящее время молочное козоводство в России развивается как самостоятельная отрасль животноводства. По данным управления статистики по Алтайскому краю поголовье коз в крае на июнь 2018 г. составляет 22414 голов, а в 2017 г. на эту дату поголовье насчитывалось 21272 головы, т.е. увеличение поголовья составило 1142 головы. Из общего поголовья козоматки составляют 10225 голов, или 45,6%. Что касается породного состава, разводимого в нашей зоне, то это те породы, о которых говорят сами козоводы: зааненская, чешская, горьковская, нубийская. К сожалению, в личных подсобных хозяйствах коз разводят без ведения племенного учета и официальных документов. Основным показателем оценки породы – это внешние признаки животного.

Козье молоко благодаря своему составу обладает высокой биологической ценностью. Его аминокислотный и липидный состав более близок к женскому грудному молоку, нежели коровье молоко, что делает его незаменимым компонентом искусственного вскармливания грудных детей. Кроме того, козье молоко является более легкоусвояемым и способствует репарации организма при многих заболеваниях (Боровков, 2008).

Общеизвестно, что на молочную продуктивность и физико-химический состав молока влияет ряд факторов: физиологические особенности животного, условия кормления, происхождение и др. (Суюнчев, 2006). На состав и свойства молока коз также влияет период лактации, в том числе и порода, от которых зависит выход и качество готовых молочных продуктов. В связи с этим, на наш взгляд, представляет определенный научный и практический интерес оценка некоторых показателей качества молока, характеризующих его технологические свойства, от коз разных пород.

Изучение козьего молока и разработка технологий на его основе позволит не только расширить ассортимент производимой продукции на территории Алтайского края, но и производить новые продукты с точки зрения интереса потребителя, новизны и лечебно-профилактических свойств (Майоров, 2013).

Для выполнения исследований перед нами была поставлена задача – оценить качество молока коз зааненской, чешской и горьковской пород. Породность коз оценивалась по экстерьерно-конституциональным признакам и пигментации волосяного покрова.

С целью выявления качества молока коз разных пород было произведено исследование сырого козьего молока от животных зааненской, чешской и горьковской породы, находящихся на третьей стадии лактации. КФХ ИП «Базарнов» находится в 30 км от города Барнаула – в экологически чистой зоне. Рацион кормления животных: сено – 1,7 кг, вода вволю, овес – 0,45 кг, отруби пшеничные – 0,2 кг, гранулы – 0,3 кг, морковь – 0,5 кг, картофель – 0,5 кг на одну голову в сутки. Доеение животных осуществляется два раза в день машинным способом. Средняя продуктивность животных составляет 1,5 л в сутки на одну дойную козочку. Оценивали качество молока, полученного от 9 голов, по три пробы от каждой породы соответственно. Молоко было консервировано путём охлаждения до ...+5 °С и транспортировано в лабораторию Алтайского ГАУ. Кислотность определяли методом титрования, показатели: жир, СОМО, белок и плотность – на приборе «Лактан 1-4».

При анализе физико-химических показателей молока коз было отмечено, что козы зааненской породы имели лучшие показатели.

Исследование молока коз разных пород показало, что наиболее высокая массовая доля жира в молоке зааненских коз – 4,86 %, что превосходит чешских на 1,1% и горьковских на 1,2% (рис. 1).

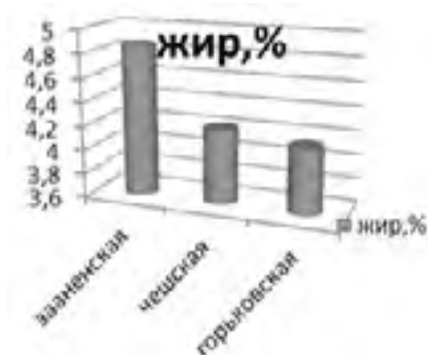


Рис. 1. Показатель жира в молоке коз разных пород

Содержание белка в молоке коз чешской породы было самым низким (3,30 %) и уступало козам зааненской и горьковской породы на 1,04 и 1,02 % соответственно.

В молоке коз представленных пород содержание СОМО колеблется от 9,13 до 8,73 %. Самое высокое – у молока, полученного от коз зааненской породы (рис. 2).

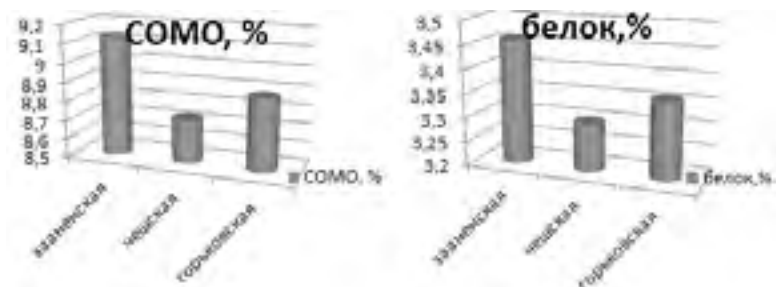


Рис. 2. Показатели СОМО и белка в молоке коз разных пород

Плотность молока – важный показатель его натуральности. Плотность цельного козьего молока изучаемых пород колеблется в пределах требований технических условий (ГОСТ 32940-2014, 2016).

Кислотность молока является показателем его свежести. Показатели титруемой кислотности молока у сравниваемых групп коз существенно не различались и были в пределах показателей, указанных в техническом регламенте (рис. 3).

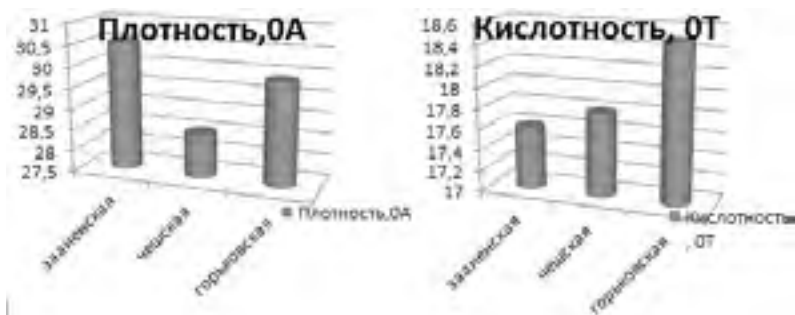


Рис. 3. Показатели плотности и кислотности в молоке коз разных пород

Козы зааненской породы превосходили сверстниц чешской и горьковской пород по всем исследуемым показателям.

На основании приведенных исследований можно сделать вывод: молоко коз зааненской, чешской, горьковской пород, полученное на территории Алтайского края, соответствует стандарту и пригодно для промышленной переработки. Однако при одинаковых условиях кормления и содержания козы зааненской породы имеют лучшие характеристики по качественным показателям молока, чем сверстницы сравниваемых пород.

Благодарим за сотрудничество главу крестьянского фермерского хозяйства Владимира Базарнова.

Библиографический список

Боровков М.Ф., Фролов В.П., Серко С.А. Ветеринарно-санитарная экспертиза с основами технологии и стандартизации продуктов животноводства / под ред. М.Ф. Боровкова. СПб., 2008. 448 с.
ГОСТ 32940-2014. Молоко козье сырое. Технические условия (действует с 1 января 2016 г.)

Майоров А.А., Щетинина Е.М. Основные породы молочных коз на территории Алтайского края // Ползуновский вестник. 2013. № 4-4. С. 78–80.

Суюнчев О.А., Самойлов В.А., Нестеренко П.Г. и др. Новые технологии продуктов из козьего молока // Сыроделие и маслоделие. 2006. № 1. С. 59–63.

УДК 632.4.01/.08

**В.Н. Кельбин, Е.С. Сколотнева, Е.М. Сергеева, С.И. Конькова,
Е.А. Салина**

Институт цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия)

**Фитопатологические и молекулярные подходы
для изучения инфекционных стадий
гриба *Puccinia graminis*,
развивающегося в условиях лесостепи Приобья ***

Стеблевая ржавчина в фитопатогенном комплексе пшеницы Западной Сибири регистрируется в последнее время с высокой частотой, в отдельные годы достигая эпифитотийного уровня развития. В статье обсуждается методический подход для исследования инфекционных стадий ее возбудителя, гриба *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, развивающегося в условиях лесостепи Приобья, представляющий собой совокупность методов фитопатологического анализа и использование молекулярных техник работы с ДНК. В результате двух проведенных дифференциаций образцов новосибирской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* определен состав генов вирулентности по Северо-Американской номенклатуре: 1) *pSr5*, *pSr9e*, *pSr7b*, *pSr6*, *pSr8a*, *pSr9g*, *pSr36*, *pSr9b*, *pSr30*, *pSr17*, *pSr9d*, *pSr10*, *pSrTmp*, *pSrMcN*; 2) *pSr21*, *pSr6*, *pSr8a*, *pSr36*, *pSr9b*, *pSr17*, *pSr24*, *pSrMcN*. Проведено сравнение эффективности различных способов гомогенизации про-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-29-08018.

бы на первом этапе выделения ДНК, представляющей собой грибные споры с прочными хитиновыми стенками. Подобраны условия проведения ПЦР из образцов ДНК различных инфекционных стадий гриба при помощи системы праймеров ITS1 и ITS4, амплифицирующих участок внутреннего транскрибируемого спейсера (Internal Transcribed Spacer). Присутствие ДНК гриба в выделенных зараженных растительных и споровых образцах подтверждалось с помощью специфичных праймеров ITS1rustF10d и StdLSUR2a. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ITS участка различных споровых стадий и образцов, уже загруженных в базу GenBank NCBI, позволил сделать предварительные выводы о том, что в Новосибирской области на дикорастущих злаках поддерживается пырейная специальная форма, не способная инфицировать пшеницу. Среди споровых образцов, прошедших половой процесс на барбарисе, вероятно присутствие нескольких специальных форм, включая пшеничную и пырейную форму. Допускается вероятность местного источника инфекции пшеницы.

Ключевые слова: стеблевая ржавчина, раса, инфекционные стадии, вирулентность, Sr-гены, молекулярные маркеры.

Введение. *Puccinia graminis* Pers. – биотрофный гриб, возбудитель стеблевой ржавчины злаков, является одним из самых агрессивных патогенов зерновых культур. Поражая растения пшеницы на всех этапах вегетации, он вызывает нарушение транспирации стеблей, снижает продукцию зерна, его хлебопекарные свойства.

В последние годы возникла реальная угроза посевам пшеницы Западной Сибири после зафиксированной в 2009 г. эпифитотии в Омске с потерями урожая 30–35%. На территории лесостепи Приобья, входящей в состав Новосибирской области, эпифитотии стеблевой ржавчины были зарегистрированы в 2007, 2010, 2011, 2016 гг. (Сочалова и Лихенко, 2015; Сколотнева и др., 2016).

Возбудитель стеблевой ржавчины *P. graminis* имеет сложную видовую структуру, причиной которой является дивергенция по растение-хозяину (Наумов, 1939). Важное практическое значение имеет пшеничная форма – *P. graminis* f. sp. *tritici*, разбивающаяся на расы

по составу генов вирулентности/авирулентности. Природные популяции патогенов могут быть половыми и бесполовыми в зависимости от жизненного цикла, реализуемого грибом. Полный жизненный цикл гриба представлен сменой пяти споровых стадий (эцио-, урединио-, телио-, базидиоспоры и спермации), развивающихся на основном и промежуточном растениях-хозяевах (пшенице и барбарисе). Однако распространена ситуация, когда цикл сокращается до летнего клонального воспроизведения урединиостадии, представляющей опасность для пшеницы. В этом случае говорят о том, что природная популяция является бесполой. Бесполое популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* с клональной структурой описаны в Канаде (Green, 1975) и Австралии (Luig, 1977).

Для возбудителя стеблевой ржавчины Новосибирской области остаются невыясненными как происхождение инфекции, так и особенности жизненного цикла гриба с выводом о том, является ли местная популяция половой или бесполой. Актуальность такого исследования очевидна в связи с нарастающей агрессивностью проявления заболевания на производственных посевах, а также ввиду существующей угрозы появления новых высоковирулентных рас семейства Ug99, распространяющихся по континенту последние десятилетия (Шаманин, 2015).

Целью наших исследований явилась разработка методического подхода для исследования местного патогена *P. graminis* f. sp. *tritici*, объединяющего как классические методы фитопатологии, так и современный инструментарий молекулярного анализа для изучения различных инфекционных стадий гриба, зафиксированных в условиях лесостепи Приобья.

Материалы и методы исследований. Материалом для изучения инфекционных стадий гриба *P. graminis* f. sp. *tritici* послужили зараженные стебли пшеницы и дикорастущих злаков с урединио- и телиоспороношениями, листья барбариса с эциоспороношениями, собранные в 2016–2018 гг. в окрестностях Новосибирска (Советский район), поселка Ключи (испытательные поля ИЦиГ), района ВАСХНИЛ (испытательные поля СибНИИРС), а также образцы, предоставленные сотрудниками ОмГАУ (Омская область). Материал хранился в условиях пониженной влажности в эксика-

торе при комнатной температуре для фитопатологического анализа, и при -80 °С для исследования с помощью молекулярных методов.

Фитопатологические методы. Размножение и поддержание культуры биотрофного гриба *P. graminis* f. sp. *tritici* проводилось стандартными методами, применяемыми для работы с ржавчинными грибами (Кирай и др., 1974), на базе ИЦиГ СО РАН, где в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений оборудовано помещение для лабораторного исследования возбудителя стеблевой ржавчины с двойной системой дверей, ультрафиолетовой дезинфекцией и ламинарным шкафом (БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 NEOTERIC – Ламинарные системы).

Для определения состава генов вирулентности возбудителя стеблевой ржавчины использовалась Северо-Американская номенклатура, разработанная Ролфзом и Мартином (Roelfs, Martens, 1987). Современный международный набор представлен 20-ю сортами и линиями пшеницы, содержащими по одному определённом гену устойчивости (Sr), дифференцирующими расы по составу соответствующих генов вирулентности (<http://www.fao.org/agriculture/crops/rust/stem/stem-pathotypetracker/stem-differentialsets/ru/>). Инфекционные типы на отдельных линиях пшеницы оценивали по пятибалльной шкале, разработанной Стэкманом (Stackman et al., 1962). При этом устойчивой реакцией растения считались инфекционные типы – «0», «1» и «2», восприимчивой – «3» и «4».

Молекулярные методы. Выделение ДНК непосредственно из урединиоспор гриба *P. graminis* проводилось согласно методике, описанной в статье (Justesen et al., 2002), а выделение ДНК из инфицированного ржавчиной растительного материала – по методу Plaschke (Plaschke et al., 2002). В исследовании были применимы различные методы гомогенизации образцов: электрический гомогенизатор, а также с использованием песка и жидкого азота. Эффективность способа гомогенизации спор оценивалась визуально с помощью электронной микроскопии на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов СО РАН при помощи CCD-камеры Axioscam 512 color и люминесцентного ми-

микроскопа Axio Scope A1 при увеличениях объектива 20 и 40 (наблюдение разрушенных спор в поле зрения) и по качеству выделенной ДНК (спектрофотометр фирмы IMPLLEN).

При постановке полимеразной цепной реакции использовали реакцию смесь (25 мкл), содержащую 2,5 мкл буфера (67 мМ Трис-HCl pH 8.8; 18 мМ(NH₄)₂; 1,7 мМ Mg; 0.01% Tween 20); 2 мкл NTPs (100 мМ/л); 1 мкл BSA (10 мг/мл); 1 е.а. Taq-полимеразы; 15,5 мкл деионизованной воды и по 0,5 мкл праймеров, синтезированных фирмой Биоссет (табл. 1). Визуализацию результатов амплификации проводили с использованием 1,5% агарозного геля.

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности используемых праймеров

Название праймера	Последовательность	Ссылка
ITS1rustF10d	5'-TGAACCTGCAGAAGGATCATTA-3'	Barnes, Szabo, 2007
StdLSUR2a	5'-AGACTGCTACATTTTCCTTAAACCC-3'	Barnes, Szabo, 2007
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	Stielow et al., 2015
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Stielow et al., 2015

Подготовка к секвенированию амплифицированного ПЦР фрагмента проводилась с помощью набора ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing ready reaction kit фирмы «Applied Biosystems». Секвенирование последовательностей осуществляли на оборудовании межинститутского Центра коллективного пользования «Геномика», поиск гомологичных последовательностей ДНК – в базе нуклеотидных последовательностей GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с помощью алгоритма BLASTn (Altschul et al., 1990).

Результаты и их обсуждение. Для выяснения состава генов вирулентности из 9 монопустульных изолятов, выделенных с зараженных стеблевой ржавчиной гербарных образцов пшеницы, собранных в Новосибирской области, был выбран изолят №3, отличавшийся от остальных высокой агрессивностью.

Оценка набора Sr-изогенных линий по устойчивости к стеблевой ржавчине в лабораторных условиях показала, что в первой дифференциации (1-Д) линии пшеницы с Sr-генами *Sr21*, *Sr11*, *Sr9a*, *Sr24*, *Sr31*, *Sr38* были устойчивы к тестируемому изоляту №3 (растения проявляли реакции 0–2 балла). Восприимчивыми оказались линии пшеницы, несущие гены *pSr5*, *pSr9e*, *pSr7b*, *pSr6*, *pSr8a*, *pSr9g*, *pSr36*, *pSr9b*, *pSr30*, *pSr17*, *pSr9d*, *pSr10*, *pSrTmp*, *pSrMcN*. Полученные данные позволили судить о составе генов вирулентности изучаемого образца популяции: *pSr5*, *pSr9e*, *pSr7b*, *pSr6*, *pSr8a*, *pSr9g*, *pSr36*, *pSr9b*, *pSr30*, *pSr17*, *pSr9d*, *pSr10*, *pSrTmp*, *pSrMcN*.

В результате второй дифференциации (2-Д) была показана устойчивость к тестируемому изоляту №3 у линий пшеницы с Sr-генами *Sr5*, *Sr9e*, *Sr7b*, *Sr11*, *Sr30*, *Sr9a*, *Sr9d*, *Sr10*, *SrTmp*, *Sr31*, *Sr38*, *SrMcN* (растения проявляли реакции 0–2 балла), но имелись различия между инфекционными типами на сортах и линиях, несущих одни и те же Sr-гены. Восприимчивыми оказались линии пшеницы, несущие гены *pSr21*, *pSr6*, *pSr8a*, *pSr36*, *pSr9b*, *pSr17*, *pSr24*, *pSrMcN*. Полученные данные позволяют судить о составе генов вирулентности изучаемого образца Новосибирской популяции патогена: *pSr21*, *pSr6*, *pSr8a*, *pSr36*, *pSr9b*, *pSr17*, *pSr24*, *pSrMcN*.

Одна из методических задач, связанных с подготовкой образцов патогена к молекулярному анализу, заключалась в отработке этапа гомогенизации пробы, представляющей собой грибные споры с прочными хитиновыми стенками. Были использованы споры трёх инфекционных стадий в различном состоянии: телиоспоры на сухих стеблях пшеницы; урединиоспоры, собранные с молодых растений, без растительного материала; эциоспоры на растительном материале, замороженные. Сравнение эффективности различных способов гомогенизации показало, что наиболее приемлемым для работы со всеми типами спор (телио-, урединио-, эцио-спор) является использование электрического гомогенизатора. Наблюдалось разрушение клеточной стенки спор во всех образцах. Метод гомогенизации с использованием песка и жидкого азота имел такую же эффективность, однако требовал больших временных затрат.

Другая сложность работы со специфическим материалом состояла в том, что практически все имеющиеся образцы спор были

неотделимы от растительного материала – стеблей и листьев зараженных растений. Поэтому при выделении ДНК всегда получали тотальную ДНК, содержащую как грибные, так и растительные фрагменты. Экспериментально было выяснено, что метод, описанный в статье (Plaschke et al., 2002), обычно используемый для выделения ДНК растений, являлся наиболее оптимальным при условии успешного разрушения клеточной стенки гриба. Таким образом, из 10–50 мг спорового материала получали 100–400 нг тотальной ДНК, концентрацию и качество которой измеряли на спектрофотометре фирмы IMPLEN.



Рис. 1. Электрофорез в 1,5% агарозном геле продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров ITS1F и ITS4. Крайние дорожки – маркер длины фрагментов ДНК (1 kbp); 1 – контроль (выделен с соломины без признаков заражения); 2–6 – разведения ДНК гриба водой (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5)

Для подбора условий проведения ПЦР из образцов выделенной ДНК была взята система праймеров ITS1 и ITS4, амплифицирующих участки внутреннего транскрибируемого спейсера (Internal Transcribed Spacer) – некодирующий участок, разделяющий гены рибосомальной ДНК у различных видов грибов и растений (Stielow et al., 2015). В качестве контроля использовалась ДНК незараженной мягкой пшеницы сорта Chinese spring. Эффективная амплификация продукта отмечалась при выполнении следующих условий: первый цикл – 94 °C, 3 мин – предварительная денатурация; 35 циклов: 1-й шаг 94 °C, 10 с – денатурация; 2-й шаг – 60 °C, 1 мин – отжиг; 3-й шаг – 72 °C, 30 с – элонгация. На рисунке 1 показаны результаты амплификации участка внутреннего транскрибируемого спейсера,

полученных при соблюдении описанных условий на ДНК матрице в различных разведениях (в воде mQ). Разведения ДНК в 50 и 100 раз оказались пригодными для успешной постановки ПЦР.

Присутствие ДНК гриба в выделенных зараженных растительных и споровых образцах подтверждалось с помощью специфических праймеров ITS1rustF10d и StdLSUR2a. Данные праймеры амплифицируют участок ITS, специфичный для грибов рода *Puccinia* (Barnes, Szabo, 2007). Было подтверждено присутствие грибной ДНК в тотальных образцах, выделенных из растений пшеницы, зараженных урединиоспорами *P. graminis*, из телиоспороношения на дикорастущем злаке рода *Elytrigia*, а также из эциоспор, собранных вместе с тканью барбариса, на листьях которого развивается эциальная стадия гриба. Все зараженные растительные и споровые образцы показали амплификацию специфичного ржавчинного фрагмента (рис. 2).

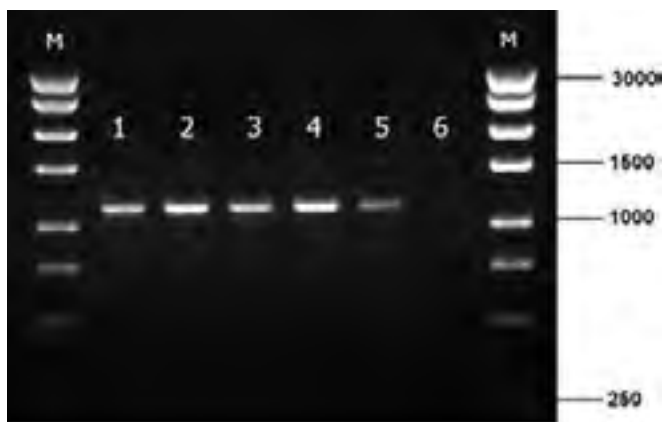


Рис. 2. Электрофорез в 1,5% агарозном геле продуктов ПЦР, полученных с использованием праймеров ITS1rustF10d и StdLSUR2a из споровых образцов различных инфекционных стадий *P. graminis*. Крайние дорожки – маркер длины фрагментов ДНК (3 kbp).

1 – зараженная урединиоспорами пшеница сорта «Чернява 13» (Омская область); 2 – зараженная урединиоспорами пшеница сорта «Чернява 13» (Новосибирская область); 3 – зараженные урединиоспорами стебли злака *Dactylis glomerata*; 4 – зараженные урединиоспорами стебли злака *Elytrigia* sp.; 5 – листья барбариса с эциоспороношением; 6 – контроль (незараженная пшеница сорта Chinese Spring)

Было проведено подтверждение вида образца при помощи секвенирования по Сэнгеру с использованием праймера ITS1rustF10d и сравнение с последовательностями ITS участка области разделения рибосомных генов, загруженными в базу GenBank NCBI.

Таблица 2

Степень сходства (процент идентичности)
между тестируемыми образцами ДНК местного патогена
и последовательностями ITS, загруженными в базу GenBank NCBI, %

Образцы ДНК патогена	Уредини- оспоры с пше- ницы (Черныя 13)	Уредини- оспоры с пырея	Эцио- споры с барба- риса
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> strain HSZ0931*	90	0	81
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>avenae</i> isolate T136	88	0	0
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>poae</i> strain HSZ0929	88	89	89
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>dactylis</i> strain HSZ0928	88	90	90
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>lolii</i> strain HSZ0802	88	91	91
<i>P. graminis</i> f. sp. <i>phlei-pratensis</i> strain HSZ0920	88	91	91
Урединиоспоры с пырея	0	–	81
Эциоспоры с барбариса	87	81	–
*Изолят пшеничной формы стеблевой ржавчины, ДНК которого рассматри- валась нами в качестве эталона для сравнения.			

Было проведено сравнение ДНК тестируемых образцов различных инфекционных стадий *P. graminis* с последовательностями ITS участка области разделения рибосомных генов, загруженными в базу GenBank NCBI. В таблице 2 приведено несколько изолятов, принадлежащих к различным специальным формам стеблевой ржавчины, с которыми было выявлено сходство с тестируемыми образцами ДНК. Сходство образца урединиоспор, собранных с пшеницы, состави-

ло 90% с изолятом HSZ0931, принадлежащим к пшеничной форме *P. graminis* (табл. 2) и принятым нами как эталон для сравнения; и менее 88% с изолятами, принадлежащими к другим специальным формам. В то же время сходство тестируемого образца урендиниоспор, собранных с пырея, с эталонным изолятом HSZ0931 было невысоким (81%), а с нашим споровым образцом с пшеницы сходства обнаружено не было (табл. 2). Это позволило нам предварительно исключить его принадлежность к пшеничной форме стеблевой ржавчины.

Образец ДНК эциоспор теоретически должен представлять собой смесь различных специальных форм, так как данная инфекционная стадия является продуктом половой рекомбинации. Полученные нами предварительные данные подразумевают присутствие нескольких специальных форм в поколении эциоспор местного патогена, включая пшеничную и пырейную формы (см. табл. 2)

Выводы. Предложен методический подход для изучения различных инфекционных стадий гриба *P. graminis*, развивающегося в условиях лесостепи Приобья, включающий методы культивирования биотрофных грибов в лабораторных условиях, методы молекулярной генетики (выделение и очистка ДНК, постановка и оптимизация условий полимеразной цепной реакции, секвенирование по методу Сэнгера); методы люминесцентной микроскопии. После успешного подтверждения эффективности разработанный подход включен в инструментарий лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики ИЦиГ СО РАН.

Определен состав генов вирулентности из двух проведенных дифференциаций, с образцами новосибирской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici*: 1) pSr5, pSr9e, pSr7b, pSr6, pSr8a, pSr9g, pSr36, pSr9b, pSr30, pSr17, pSr9d, pSr10, pSrTmp, pSrMcN; 2) pSr21, pSr6, pSr8a, pSr36, pSr9b, pSr17, pSr24, pSrMcN. После прохождения статистической проверки полученные данные могут быть использованы для выработки стратегий борьбы с патогеном и опережающей селекции на иммунитет. Зная генетический состав расы, доминирующей в патогенной популяции, селекционеры пшеницы могут создавать сорта для производства, устойчивые к локальной инфекции.

Составлены предварительные выводы о принадлежности к специальным формам *P. graminis* инфекционных стадий гриба, об-

наруженных в Новосибирской области: на дикорастущих злаках в регионе поддерживается пырейная специальная форма, не способная инфицировать пшеницу (Наумов, 1939); среди споровых образцов, прошедших половой процесс на барбарисе, вероятно присутствие нескольких специальных форм, включая пшеничную и пырейную формы. Следовательно, допускается вероятность местного источника инфекции пшеницы.

Библиографический список

- Кирай З., Клемент З., Шоймоши Ф. Методы фитопатологии. М., 1974.
- Наумов Н.А., Гешель Е.Е., Шитикова-Русакова А.А. Ржавчина хлебных злаков в СССР: монографическая сводка. М., 1939.
- Сколотнева Е.С., Салина Е.А. Особенности возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы в условиях Западной Сибири // Защита зерновых культур от болезней, вредителей, сорняков: достижения и проблемы : материалы Международной научно-практической конференции. Большие Вяземы, 2016. С. 67–71.
- Сочалова Л.П., Лихенко И.Е. Генетическое разнообразие яровой пшеницы по устойчивости к мигрирующим заболеваниям. Новосибирск, 2015.
- Шаманин В.П., Моргунов А.И., Петуховский С.Л. и др. Селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине в условиях Западной Сибири – реальность и перспективы. Новосибирск, 2010. 287 с.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool // Journal of molecular biology. 1990. N 215(3). P. 403–410.
- Barnes C.W., Szabo L.J. Detection and identification of four common rust pathogens of cereals and grasses using real-time polymerase chain reaction // Phytopathology. 2007. N 97(6). P. 717–727.
- Green G.J. Virulence changes in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Canada // Canadian Journal of Botany. 1975. N 53(14). P. 1377–1386.
- Justesen A.F., Ridout C.J., Hovmøller M.S. The recent history of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers // Plant pathology. 2002. N 51(1). P. 13–23.
- Luig N.H. Wheat rust survey 1976-77. The University of Sydney Plant Breeding Institute. 1977.

Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // Theoretical and Applied Genetics. 1995. N 91(6-7). P. 1001–1007.

Roelfs A.P., Martens J.W. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. changes, 1501(1960s). 1987.

Stackman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. USDA. Agricultural Research Service. 1962. 617 p.

Stielow J.B., Lévesque C.A., Seifert K.A., Meyer W., Iriny L., Smits D., Lomascolo A. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes // Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. 2015. N 35. P. 242.

УДК 581.412:633.877

И.В. Киргизова¹, А.М. Гаджимурадова²

¹Омский государственный технический университет (Омск, Россия)

²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева (Астана, Казахстан)

Влияние вирусной инфекции картофеля (PVY⁰) и (PVS^A) на биохимические показатели уровней антиоксидантных ферментов у разных генотипов картофеля

Влияние биотического стресса на растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) приводит к резкому увеличению уровня активных форм кислорода, в ответ на повышение уровней которых увеличивается содержание антиоксидантных ферментов. Исследовано влияние вирусной инфекции картофеля PVY⁰ и PVS^A на активность аккумуляции антиоксидантных ферментов пероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы у разных генотипов картофеля российской

и казахстанской селекции. В результате проведенных экспериментов было установлено резкое повышение содержания данных ферментов в клетках растений в ответ на повышение уровней активных форм кислорода. Уровни генерации антиоксидантных ферментов у растений картофеля варьировали от сорта к сорту. Например, в сорте казахстанской селекции Улан отмечено длительное сохранение активности ферментов пероксидазы и каталазы на 5-й и 7-й день после инфицирования вирусом PVSA, у сорта Хозяюшка отмечено резкое повышение активности фермента каталазы на 3-й день после инфицирования PVY⁰, что более чем в три раза выше по сравнению с контрольными вариантами.

Ключевые слова: картофель, вирусы, PVY⁰, PVSA, стрессовый фактор, антиоксидантные ферменты, каталаза, пероксидаза.

Введение. Растения картофеля постоянно подвержены воздействию агрессивных факторов окружающей среды. Вирусы ежегодно являются одной из главных причин снижения количества и качества урожая картофеля, приводя к экономическим потерям и снижая продовольственную безопасность многих стран.

Для культуры картофеля наиболее вредоносными вирусами, которые широко распространены на территории Западной Сибири и Казахстана, являются вирус скручивания листьев картофеля (PLRV), Y вирус картофеля (PVY), X вирус картофеля (PVX), S вирус картофеля (PVS), M вирус картофеля (PVM) (Рогозина, 2016).

Развитие вирусной инфекции на культуре картофеля в течение нескольких генераций может приводить не только к снижению качественных характеристик и урожайности, а также к полному вырождению перспективных сортов картофеля.

Наиболее агрессивным и широко распространенным вирусом картофеля на территории Западной Сибири и Северного Казахстана является вирус Y (PVY⁰). Вирус картофеля Y – это РНК-содержащий вирус с высокой скоростью мутаций и многочисленными рекомбинантами для генерации огромного генетического разнообразия, за счет чего данный вирус выживает в различных условиях окружающей среды и может приводить к некрозам растений картофеля (Mori,

2004, Visser, 2012).

Симптомами инфицирования штаммом вируса у растений картофеля являются тяжелые мозаики и некрозы листьев. Вторичные симптомы поражения вирусом PVY⁰ имеют более ярко выраженную мозаику на листьях и тяжелый некроз на стеблях и жилках листовых пластин, приводящих в последующем к их отмиранию (Glais, 2002).

Также все большее значение для изучения вирусоустойчивости культуры картофеля приобретает PVS-вирус картофеля (Wang, 2016).

Вирус картофеля PVS может приводить к снижению урожайности культуры картофеля до 20%, а также ухудшению его качественных характеристик. Он встречается повсеместно, во всех регионах, где выращивают картофель (Karasev, 2011).

При инфицировании растений картофеля симптомы вирусной инфекции (PVS) не проявляются. Наиболее чувствительные сорта картофеля реагируют на вирусную инфекцию небольшим углублением жилок, появляются огрубение листьев, а также пятнистость и некротические пятна на листьях. Штамм вируса PVS (PVS^A), в отличие от более широко распространенного штамма вируса PVS⁰, вызывает более серьезное поражение растений картофеля, приводящее к преждевременному отмиранию листьев.

Вирусные заболевания картофеля приводят к значительным экономическим потерям, а также снижению качественных характеристик семенного картофеля (Anderson et al. 2004; Al-Taleb et al. 2011; Enciso-Rodriguez et al. 2018).

В настоящее время стало известно, что растения в ходе эволюции для борьбы с негативными факторами окружающей среды выработали естественные механизмы защиты, которые основаны на повышении активных форм кислорода (ROS) и активации антиоксидантной системы (Rasmussen et al. 2013). Активные формы кислорода (ROS)-реакционноспособные молекулы, которые образуются у растений в нормальных условиях и необходимы для обезвреживания фитопатогенов, синтеза лигнина, процессов старения, метаболизма фитогормонов. К основным молекулам активных форм кислорода относятся: синглетный кислород (¹O₂), перекись водорода (H₂O₂), гидроксильный радикал (OH·), супероксид (O₂⁻) (Wang et al. 2003; Laloï, 2004). Повышение уровней активных форм кислорода

может непосредственно убивать патогены посредством ROS-опосредованной деградации их белков, нуклеиновых кислот и воздействия на мембраны, а также путем ингибирования прорастания спор инфекционных возбудителей (Suzuki, 2014).

Однако в результате действия стрессовых факторов окружающей среды уровни ROS могут резко увеличиваться и оказывать токсичный эффект на клетки и ткани растений путем окислительного повреждения мембран, белков и нуклеиновых кислот, а также спровоцировать развитие фотоингибирования и нарушения процессов фотосинтеза. Ключевую роль в защитном механизме растительных клеток от кислородных интермедиантов ROS, оказывают высокомолекулярные соединения – антиоксидантные ферменты, которые обезвреживают супероксидные радикалы и перекисные соединения в клетках (Балакина, 2012).

Так, известно, что антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутазы (SOD), пероксидазы (PEX), каталаза (CAT), а также ферменты аскорбат-глутатионового цикла, принимают непосредственное участие в поддержании оптимальной концентрации уровней активных форм кислорода (Кузнецов, 2009). В связи с этим все большее внимание привлекают исследования, направленные на изучение механизмов естественного иммунитета растений в ответ на воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе вирусной инфекции на молекулярном уровне. В связи с этим целью данной работы было изучение влияния У и S вирусов картофеля на механизмы регуляции окислительного стресса у растений *Solanum tuberosum* L. разных генотипов.

Материалы и методы исследований. В качестве объектов исследований использовались безвирусные растения картофеля омских сортов: Хозяюшка, Алена, Ермак (СИБНИИСХ) и сорта казахстанской селекции: Улан, Альянс (КазНИИ семеноводства и картофелеводства).

Безвирусные растения сортов Ермак, Алена, Хозяюшка были получены на кафедре химической технологии и биотехнологии Омского государственного технического университета. Сорта казахстанской селекции были любезно предоставлены сотрудниками Казахского научно-исследовательского института картофелеводства и овощеводства (Алматы).

Очищенные вирусные изоляты PVY⁰, PVSA были получены в лаборатории биотехнологии и микробиологии РГП на ПХВ Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева.

Растения выращивали на обогащенной и предварительно автоклавированной почве (Terra vita) в световой комнате в условиях искусственного освещения при 3000 ЛК с периодичностью освещенности – 16 часов – освещения и 8 часов темноты, при относительной влажности 70–80% и температуре 25±20 °С. Горшки для посадки растений промывались дезинфицирующим раствором «Белизна». Полив растений осуществляли три раза в неделю одинаковым количеством дистиллированной воды.

Для инокуляции вирусами подбирали растения со сходными морфологическими признаками – высотой, общей вегетативной массой и развитием листовых пластинок.

Инфицирование растений картофеля проводилось путем инокуляции двух средних листовых пластинок свежеприготовленной смесью (100 мкл на одну листовую пластинку) вирусной РНК и фосфатного буфера в соотношении 1:3. Сорта Алена, Хозяюшка, Ермак инфицировались штаммом У вируса картофеля (PVY⁰), сорта Улан, Альянс инфицировались штаммом S вируса картофеля (PVS^A). Контрольную группу растений обрабатывали инокуляционной смесью с фосфатным буфером. В состав инокуляционной смеси входили 10 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 6,9) и карборандума (d-0,037 мм).

Активность фермента каталазы (CAT) определяли спектрофотометрически по снижению поглощения перекиси водорода при 240 нм в течение 120 с. Уровень активности ферментов рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции перекиси водорода (40 М·л·см⁻¹) и выражали в мМ Н₂О₂/мин·мг белка (Аебу, 1984).

Для определения активности пероксидазы (РЕХ) использовали колориметрический метод по Бояркину. Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина до образования синего продукта его окисления в присутствии перекиси водорода и пероксидазы (Ермаков и др., 1987.)

Результаты и их обсуждение. Растения картофеля сортов Алена, Ермак, Хозяюшка, инфицированные штаммом вируса PVY⁰, в пол-

ной мере проявляли типичные для данного вируса внешние признаки развития вирусной инфекции. Визуальное наблюдение признаков выявило такие морфологические признаки развития инфекции, как полосчатая мозаика и точечных некрозов на инокулированных листьях. Растения картофеля сортов Улан и Альянс, зараженные вирусом PVSA, внешние признаки проявляли в незначительной степени. Растения тестировали на наличие и отсутствие вирусной инфекции (PVS и PVY) методом иммунохроматографического анализа (Bioreba, Швейцария).

Исследования показали, что изучаемые генотипы картофеля имели различные уровни генерации антиоксидантных ферментов CAT, SOD и PEX на 3-й, 5-й и 7-й день после заражения.

Активность каталазы определяли спектрофотометрическим методом, основанном на способности фермента катализировать разложение перекиси водорода до воды и молекулярного кислорода. В образцах листьев контрольной группы растений картофеля наблюдалась пониженная активность фермента CAT по сравнению с опытной группой растений. Так, у контрольной группы растений омских сортов картофеля Ермак уровень активности CAT составил 399,6 ммоль/г*мин, у сорта Алена – 359,4 ммоль/г*мин, а у сорта Хозяюшка – 162,5 ммоль/г*мин. На третьи сутки культивирования наблюдался пик активности фермента CAT, у инфицированных растений картофеля сорта Алена максимальный уровень отмечен – 917,3 ммоль/г*мин, у сорта Ермак – 804,5 ммоль/г*мин, у сорта Хозяюшка – 523,0 ммоль/г*мин.

Снижение уровня антиоксидантных ферментов каталазы (CAT) отмечался на 5-й и 7-й день, однако у сорта Хозяюшка активность фермента сохранялась и на 7 сутки культивирования на уровне, превышающем контроль на 44 %, соответственно.

В контрольной группе растений активность фермента CAT у сортов Улан и Альянс составляла 193,3 и 412,7 ммоль/г*мин соответственно. Снижение уровня каталазы наблюдалось на 6–7-е сутки культивирования, наибольшая активность у инфицированного вирусом S сорта Альянс наблюдалась на 3-и сутки культивирования и превышала контроль на 114%.

Далее изучали активность ферментов пероксидазы. Данный фермент имеет более высокое сродство к H_2O_2 , чем ферменты антиокси-

дантной системы CAT и SOD, и играет более важную роль в управлении реакциями, вызванными повышением ROS во время стресса.

Усиленная экспрессия пероксидазы в растениях была продемонстрирована в условиях заражения вирусами.

Максимальный уровень активности пероксидазы среди сортов казахстанской селекции в ответ на поражение вирусом PVS (PVS^A), отмечался у сорта Альянс и составлял – 24,5 ед./г сырой массы на 3-й день после заражения. На на 5-е сутки у инфицированных растений наибольшую активность показал сорт Улан – 9,4 ед./г сырой массы. На 7-й день активность фермента была практически на одном уровне и была выше контроля в среднем в 1,5 раза у обоих сортов Улан и Альянс.

При изучении уровня генерации антиоксидантных ферментов пероксидазы при инфицировании У вирусом картофеля (PVY0) у омских сортов Алена и Хозяюшка уровни активности были практически одинаковы и отклонялись от контрольной группы растений в среднем на 3-й день – в 2 раза, на 5-й день – в 2,2 раза, а на 7-й день – в 2 раза. Уровень генерации фермента пероксидазы у сортов Алена – на 3-й день – 9,5 ед./г сырой массы, у сорта Ермак составлял 10,1 ед./г сырой массы, а у сорта Хозяюшка – 17,8 ед./г сырой массы. На 7-й день у трех сортов активность достигала в среднем 5,5 ед./г сырой массы.

При изучении уровней активности у всех изучаемых генотипов картофеля при культивировании на фоне снижения активности пероксидазы наблюдалось увеличение активности фермента каталазы (CAT) и наоборот.

Выводы. Реакции растений картофеля в ответ на воздействия биотических стрессоров значительно зависит от стадии его онтогенетического развития и условий окружающей среды. Повышенные концентрации активных форм кислорода (ROS) хотя и принимают участие в естественном механизме защиты растений от стрессоров, являются высокотоксичными соединениями для растений и нейтрализуются антиоксидантной системой растений.

Повышенная активность фермента каталазы у растений картофеля при инфицировании вирусами PVS и PVY может быть ассоциирована с повышенными концентрациями перекиси водорода при

инфекции. В ходе проведенных исследований у разных генотипов картофеля сибирских сортов Алена, Хозяюшка, Ермак и сортов казахстанской селекции Улан, Альянс в условиях вирусного заражения было отмечено резкое повышение уровня каталазы (САТ) и пероксидазы (РЕХ) на 1–3-и сутки культивирования, однако уровень данных ферментов к 7-му дню инфицирования заметно снижался.

Данный факт может свидетельствовать об активном иммунном ответе у всех изучаемых сортов картофеля в ответ на заражение вирусами. Активация уровней каталазы может свидетельствовать о непосредственном участии фермента в защитных механизмах растений путем понижения активности перекиси водорода в клетках растений картофеля в пораженных участках и может принимать участие в понижении окислительного стресса растений.

Активация уровней пероксидазы при появлении молекул перекиси водорода, возможно, вызывает окисление фенольных соединений при взаимодействии вирусной инфекции и клеток растений картофеля, что в свою очередь вызывает образование свободных радикалов, которые достаточно токсичны для развития вирусов.

В результате проведенных исследований возможно сделать вывод о более активном иммунном ответе в ответ на инфицирование У вирусом (PVY⁰) у раннего сорта картофеля Ермак по сравнению с сортами Алена и Хозяюшка на основании более высоких концентраций перекиси водорода и генерации антиоксидантных ферментов каталазы и пероксидазы. Среди сортов казахстанской селекции наибольшей активностью антиоксидантной системы обладал среднеспелый сорт картофеля Улан, который, вероятно, является более устойчивым к воздействию S-вируса картофеля (PVSA).

В связи с этим более детальное изучение механизмов регуляции метаболизма активных форм кислорода у растений картофеля под влиянием вирусных инфекций является одной из актуальных проблем современной науки, которые могут стать основой для создания новых стратегий борьбы с вирусными инфекциями растений на основных экономически важных культурах растений.

*Авторы выражают благодарность
заведующему кафедрой биотехнологии и микробиологии
Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева,
кандидату биологических наук, профессору
PhD Рустему Туkenовичу Омарову
за консультационные советы в области биохимии растений.*

*Также авторы выражают благодарность
сотрудникам лаборатории генетики и биохимии микроорганизмов
и заведующему лабораторией Национального центра биотехнологии,
кандидату биологических наук Бекболату Бауржановичу Хасенову.*

Библиографический список

- Aeby H. Catalase in vitro // *Methods Enzymol.* 1984. N 105. P. 121–126.
- Al-Taleb M. M., Hassawi D. S., Abu-Romman S. M. Production of virus free potato plants using meristem culture from cultivars grown under Jordanian environment // *The American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences.* 2011. N 4. P. 467–472.
- Anderson P. K. et al. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers // *Trends in Ecology & Evolution.* 2004. N 10. P 535–544.
- Azpilicueta C.E., Benavides M.P., Tomaro M.L., Gallego S.M. Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves // *Plant Physiol. Biochem.* 2007. N 45. P. 589–595.
- Balakina A.A., Kunina YU.V., Terent'ev A.A., Kalashnikova E.A., Izuchenie aktivnosti fermentov antioksidantnoj sistemy na razlichnyh etapah kul'tivirovaniya lyupina uzkolistnogo (*Lupinus angustifolius* L.) *in vitro* // *Izvestiya vuzov. Prikladnaya himiya i biotekhnologiya.* 2012. № 1(2). C. 78–83. (in Russian).
- Dajic Z., Ed.Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Janardhan Reddy K. Salt Stress. In *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants.* Germany: Springer, 2006. P. 41–82.
- Enciso-Rodriguez F. et al. Genomic Selection for Late Blight and Common Scab Resistance in Tetraploid Potato (*Solanum tuberosum*) // *G3: Genes, Genomes, Genetics.* 2018. N 8(7). P. 2471–2481.DOI: 10.1534/g3.118.200273.

Ermakov A.I., Arasimovich V.V., YArosh N.P., Peruanskij YU.V., Lukovnikova G.A., Ikonnikova M.I. Metody biohimicheskogo issledovaniya rastenij. Agropromizdat. 1987. 41–45 p. (in Russian).

Glais L., Tribodet M., Kerlan C. Genomic variability in potato virus Y (PVY⁰): evidence that PVYN and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVY0 and PVYn isolates // Archives Virol. 2002. N 147. P. 64–70.

Karasev A.V., Hu X.J., Brown C.J., Kernal C., Nikolaeva O.V., Crosslin J.M., Gray S.M. Genetic diversity of the ordinary strain of Potato virus Y (Y) and origin of recombinant PVY Strains // Phytopathology. 2011. N 101. P. 778–785.

Kuznecov V.I. Fiziologicheskie mekhanizmy adaptacii i sozdanie stress-tolerantnyh rastenij // Problemy ehksperimental'noj biologii. 2009. 116 p. (in Russian).

Laloi C., Appel K., Danon A. Reactive oxygen signalling: The latest news. Curr. Opin // Plant Biol. 2004. N 7. P. 323–328.

Mori I.C., Schroeder J.I. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction // Plant Physiol. 2004. N 135. P. 702–708.

Rasmussen S., Barah P., Suarez-Rodriguez M.C., Bressendorff S. et al. Transcriptome responses to combinations of stresses on Arabidopsis // Plant Physiol. 2013. N 161. P. 1783–1794.

Rogozina E.V., Mironenko N.V., Afanasenko O.S., Macuhito Y.U. Shiroko rasprostranennye i potencial'no opasnye dlya rossijskogo agroproduktstva vzbuditeli virusnyh boleznej kartofelya // Vestnik zashchity rastenii. 2016. № 4(90). C. 24–33 (in Russian).

Suzuki N., Rivero R.M., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. Abiotic and biotic stress combinations // New Phytol. 2014. N 203. P. 32–43.

Visser J.C. The Recent Recombinant Evolution of a Major Crop Pathogen, Potato virus Y // PLoS ONE. 2012. N 11. doi:10.1371/journal.pone.0050631.

Wang J. et al. RT-PCR Differentiation, Molecular and Pathological Characterization of Andean and Ordinary Strains of Potato virus S in Potatoes in China // Plant Disease. 2016. N 8. P. 1580–1585.

Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought; salinity and

extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance // Planta. 2003. N 218. P. 1–14.

УДК 636.294:637

В.Г. Луницын

*Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий
(Барнаул, Россия)*

Биотехнологические методы переработки продукции пантового оленеводства

Представлены результаты многолетних исследований по переработке продукции пантового оленеводства в биологически активные субстанции с применением современного оборудования и материалов. Ввиду того, что традиционные методы консервирования продукции (водная варка, жаровая и ветровая сушки) длительны и трудоемки, а получаемое сырье не всегда соответствует требованиям, отработана технология получения сухих биосубстанций с использованием вакуумной, инфракрасной сушек, СВЧ-энергии. По данным биохимических и биологических исследований по ряду показателей побочная продукция превосходит основную. Многочисленными экспериментами установлена степень экстракции (водная, спиртовая) сырья маралов, биохимический состав и биологическая активность экстрактов с выявлением оптимальных. Приведены материалы высокотемпературной водной экстракции, ферментации в термостате и ультразвуковой камере с использованием ферментов животного, растительного и микробного происхождения продукции мараловодства. Применение биотехнологических методов в переработке продукции пантового оленеводства позволяет извлекать свыше 90% сухих веществ из сырья, получать растворимые концентраты с высокой биологической активностью. Исследованы биохимические и биологические свойства кожи пантов и шкуры марала. Биологи-

ческая активность шкуры марала позволяет рассматривать ее в качестве дополнительного сырья при производстве биосубстанций. Разработана и запатентована технология диспергирования цельной крови оленей, которая дает возможность исключить процесс дефибринирования крови и ее сохранения свыше 30% при заборе. С целью расширения спектра продуктов функционального питания на основе сырья пантовых оленей провели исследования по сочетанию гидролизатов и крови оленей, что позволило создать и запатентовать 6 новых биопродуктов, в состав которых, помимо цельной крови маралов, входят гидролизаты из побочного сырья маралов. Длительными масштабными экспериментальными исследованиями отработана новая технология переработки основной и побочной продукции пантового оленеводства в растворимые концентраты для пищевой, косметической промышленности и лечебно-профилактической медицины.

Ключевые слова: пантовое оленеводство, продукты, переработка.

Введение. Продукция пантового оленеводства, вне всякого сомнения, значима в традиционной корейской и китайской медицине, где в комплексных препаратах используют свыше 25 органов и частей тела маралов и пятнистых оленей. Передающиеся из поколения в поколение рецепты профилактических и лечебных препаратов, содержащих в обязательном порядке продукцию пантового оленеводства, являются основой народной медицины стран Азиатско-Тихоокеанского региона. У нас традиционно заготавливают панты, мясо, кровь, половые органы самцов, плоды, сухожилия, хвосты, шкуры (Маракуев, 1935; Кузнецов, 1947; Размахнин и др., 1977).

Тысячелетнее применение органов и тканей маралов и пятнистых оленей в восточной медицине свидетельствует об их высоких лечебно-профилактических свойствах (Богачев и др., 1994). Панты используют для восстановления мышечной силы, при истощении, для усиления половой потенции, заживления ран. Из хвостов готовят лекарства от малокровия, худосочия, для лечения почечных заболеваний и импотенции. Половые органы самцов применяют как средство, возбуждающее половую деятельность мужчин, а порошки и отвары из эмбрионов – как противоядие общего характера и в ка-

честве средства, способствующего лечению бесплодия у женщин. Кровь пантовых оленей употребляют при слабости, импотенции, упадке сил, женских болезнях, мясо увеличивает жизненные силы, укрепляет основные внутренние органы, питает кровь (Луницын, 2013). О том, что продукты пантовых оленей обладают лечебно-профилактическими свойствами, известно было еще с момента зарождения отрасли от китайских купцов. В те времена люди применяли панты, кровь животных и пантовые ванны как общеукрепляющие, бодрящие средства и при определенных болезнях. В этих же целях готовили водочные настои и отвары из половых органов самцов, хвостов, сухожилий и плодов маток. В советские времена до 50...60% пантов, производимых в России (в основном элитная и первоклассная продукция), экспортировали в страны Юго-Восточной Азии, оставшиеся перерабатывали в пантокрин на Московском и Хабаровском химфармзаводах. Консервированные хвосты, сухожилия, плоды, половые органы самцов также экспортировались, мясо шло в пищу, из крови готовили пантогематоген, изобретенный В.К. Новиковым в 1952 г. На маральниках в период консервирования пантов применяли пантовый отвар (Луницын, 2004).

В новых экономических условиях отечественными переработчиками производится свыше трехсот наименований БАДов, лечебно-профилактических и косметических средств, пищевых добавок, содержащих продукцию пантового оленеводства, для изготовления которых в основном используют кровь (80%), панты (15–18%), мясо (1,5–2,0%). Другая перечисленная выше продукция, к сожалению, не востребована. Используемые предпринимателями методы переработки сырья (измельчение, спиртовая и водная экстракции) в большинстве случаев энерго- и трудозатратны, характеризуются значительными потерями биологически-активных веществ, а конечный продукт из-за несовершенств технологий переработки – низкого качества (Луницын, 2014).

В целях повышения рентабельности отрасли нами изучается возможность более полного использования продукции маралов как лекарственного сырья для создания отечественного рынка лекарственных препаратов и пищевых добавок. В связи с этим апробированы новые способы получения биологически активных субстанций

из пантов и побочной продукции пантового оленеводства, минуя трудоемкий процесс консервирования.

Материалы и методы исследований. Научные исследования проведены во Всероссийском научно-исследовательском институте пантового оленеводства в 2004–2017 гг. Материалом для исследований служила продукция пантового оленеводства (панты, мясо, кровь, половые органы самцов, плоды маток, хвосты, сухожилия, шкуры), взятые от маралов ФГУП «Новоталицкое» Чарышского района Алтайского края. Для совершенствования технологии переработки продукции пантового оленеводства использовали современное оборудование (вакуумная и инфракрасная суши, СВЧ-энергия, ультразвуковая установка), ферменты животного, растительного и микробного происхождения. В каждом случае при постановке экспериментов по общепринятым методикам готовили схемы опытов, а качество полученной продукции по отработанным технологиям оценивали данными биохимических и биологических исследований, проводимых в научных учреждениях Барнаула, Новосибирска и Москвы. Определение биохимического состава опытных образцов проводили согласно общепринятым методикам: содержание массовой доли белка – по Кьельдалю; массовой доли жира по ГОСТ 13496,15-85; массовой доли золы – по ГОСТ 26226-84, воды по ГОСТ 9793-74; аминокислотный состав определяли с использованием аминокислотного анализатора «Hitachi L-8800»; общие аминокислоты выявляли аминокислотным анализатором «Hitachi L-835»; количество витаминов – в автоматическом многофункциональном анализаторе близкой инфракрасной области спектра прибором «Infrapid-61»; содержание фосфора по ГОСТ 266522-85; кальция по ГОСТ 26570-85. Жирокислотный состав и липиды – методом газожидкостной хроматографии, минеральный состав – методом массспектрометрии с индуктивной связанной плазмой (МС-ИСИ) и атомноспектрометрией с индуктивной связанной плазмой (АЭС-ИСП). Содержание гармонов и факторов роста определяли иммуноферментным методом с применением стандартных диагностических наборов немецкой фирмы JBL, американской DSL, EGF, B@D Systems, CHEMICON; австрийской Bender Medsystems по общепринятым методикам. Биологическую активность, которая является основой при определении качества биосуб-

станций, оценивали тремя тестами: гипотензивным, тонизирующим и гонадотропным по общепринятым методикам на кроликах, белых мышах и крысах (Александров и др., 2003). Полученные данные подвергали стандартной статистической обработке с использованием персонального компьютера INTEL PENTIUM IV в операционной системе Windows XP с помощью программы *Microsoft Excel*.

Результаты и их обсуждение. Под консервированием продукции пантового оленеводства подразумевают постепенное удаление влаги с 70 до 10–15%, с применением водных варок, жаровых и ветровых сушек, при этом сырье – панты, половые органы самцов, хвосты, сухожилия, плоды сохраняют в целости. Процесс консервирования длителен (от 10 до 35 суток в зависимости от сырья), а при несоблюдении температурных режимов возможен пережог субстрата или порча (гниение). Следовательно, качество продукции во многом зависит от субъективных факторов.

Применение продукции пантового оленеводства, как основной (панты), так и второстепенной (мясо, хвосты, половые органы самцов, плоды, сухожилия), в нативном виде (порошок) или спиртовых и водных экстрактах предполагает ее предварительное измельчение. Перед измельчением с пантов снимают кожу, при этом потери массы составляют свыше 16%, соответственно, уменьшается количество биологически активных веществ. Таким образом, традиционные способы консервирования трудоемки, энергозатратны, при этом продукция не всегда соответствует требуемому качеству, а при водной и спиртовой экстракции лишь 3–10% сухих веществ переходит в экстракт.

При консервировании продукции должен соблюдаться основной принцип – температура не выше 55 °С, в противном случае, по мнению большинства исследователей, разрушаются биологически активные вещества, что отрицательно сказывается на качестве биосубстанций, хотя широко используемые пантовые ванны эффективны при лечении опорно-двигательного аппарата, где в процессе варки пантов температура близка к кипению.

Нами в течение последних 15 лет отрабатываются новые технологии получения биосубстанций из продукции мараловодства с использованием современных средств и методов. Изначально мы приобрели

необходимое оборудование по измельчению сырья (костедробилки, мясорубки, мельницы) и его сушки (вакуумная, инфракрасная сушки, СВЧ-печь). Для получения высокоактивных порошковых биосубстанций всю продукцию пантового оленеводства, минуя трудоемкий процесс традиционного консервирования (панты вместе с кожей, мясо, половые органы самцов, хвосты, сухожилия, плоды, шкуры), кроме крови, измельчали на мясорубках и костедробилках в фарш. Апробируя вакуумную, инфракрасную сушки, СВЧ-энергию в комбинации в зависимости от сырья или только одной из них и контролируя качество биопродуктов биохимическими и биологическими исследованиями каждого вида сырья, отработали и запатентовали технологии его переработки в порошковые биосубстанции.

Таблица 1

Биохимический состав и биологическая активность биосубстанций из продукции пантового оленеводства

Биосубстанция	Сумма минеральных веществ, усл.ед.	Сумма витаминов, усл.ед.	Сумма аминокислот, г/кг	Биологическая активность, %
Панты марала	351,65±20,3	27,30±8,4	7,03±0,8	24,30±3,2
Панты пятнистого оленя	790,05±26,7	21,45±3,2	16,70±1,3	28,10±4,8
Кровь марала	1029,46±54,8	3,75±0,8	26,6±1,2	26,50±5,1
Кровь пятнистого оленя	351,65±22,3	61,99±4,4	5,33±0,6	24,30±3,3
Мясо марала	324,81±16,4	138,51±13,2	31,80±3,3	35,60±6,4
Хвосты	172,32±19,5	136,07±16,1	37,30±4,1	20,90±2,8
Плоды	382,61±17,7	119,20±11,5	22,20±0,8	16,80±1,4
Половые органы самцов	155,06±11,4	118,39±14,4	32,30±3,2	18,40±1,5
Кожа пантов 380,4±18,9 111,4±9,2 21,30±0,9				23,20±1,1
Шкура	150,5±22,2	98,4±8,3	25,41±0,7	20,0±1,7

Таблица 2

Сравнительный биохимический состав биосубстанций
из пантов и крови маралов

Показатели	Панты	Кровь
Сумма общих аминокислот (кг/1г)	578,8±18,3	534,2±15,6
Сумма свободных аминокислот (кг/1 г)	3,76±0,08	2,12±0,03
Сумма витаминов (кг/100 г)	129,3±8,4	138,2±10,4
Сумма макроэлементов (кг/г)	181,8±12,4	15,3±0,4
Сумма микроэлементов (кг/г)	65,6±3,4	24,4±1,5
Тестостерон (пг/г)	512,0-718,0	341,0-934,0
Эстрадиол (пг/г)	264,0-438,0	32,0-328,0
Дегидроэпиандростерон ДГЭА (нг/г)	14,8-18,2	336,0-684,0
Инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF1) (нг/г)	213,0-482,0	267,0-680,0
Инсулиноподобный фактор роста-2 (IGF2) (нг/г)	314,0-2218,0	384,0-1832,0
Альфа-трансформирующий фактор роста (TGF-α) (пг/г)	162,0-284,0	182,0-364,0
Бета-трансформирующий фактор роста (TGF-β) (нг/г)	29,5-918,4	42,1-764,0
Эпидермальный фактор роста (EGF) (пг/г)	26,8-113,2	13,0-108,0
Фактор роста нервов (NGF) (пг/г)	33,4-285,2	64,7-522,0
Цилиарный нейротрофический фактор (NGF3) (CNTF) (пг/г)	134,0-142,0	139,0-162,0
Костный морфогенетический протеин-4 (BMP-4) (пг/г)	51,0-122,0	38,0-85,0
Интерлейкин-2 (пг/г)	124,0-210,0	214,0-385,0
Интерлейкин-6 (пг/г)	44,0-182,0	63,0-312,0

В процессе проведения исследований выявили возможность получения из значительно минерализованных пантов качественных биосубстанций за счет добавления в них крови оленей при сушке; возможность переработки пантов с кожей, а также использованием шкуры животного для получения биологически активных продуктов, а из мяса маралов – высокоценной биосубстанции. Выход

готовых продуктов обусловлен консистенцией сырья (влагоемкостью), а скорость сушки зависит от массы загрузки сырья и степени ее измельчения. Максимальный выход сухого вещества был у сухожилий (52,2%), пантов (37,4%) и половых органов самцов (33,4%) за счет более плотной структуры данной продукции. Матки с эмбрионами и околоплодной жидкостью имели наименьший выход сухого вещества (3,5%). При сушке по разработанной технологии выход сухого вещества у мяса составил 23%, крови – 21%, хвостов и кожи – по 24%.

Наибольшая длительность сушки отмечена при консервировании сухожилий и половых органов самцов маралов (10,5 и 15,0 ч), а наименьшая – при консервировании крови (4,0 ч), матки с эмбрионами и околоплодной жидкостью 5,0 ч, мяса и кожи 4,5 ч за счет наличия большого процента влаги в тканях этого сырья.

В соответствии с данными таблицы 1 можно заключить, что максимальную биологическую активность имели мясо, затем панты и кровь оленей, по другим отдельным показателям так называемая второстепенная продукция превосходит основную, а разнокачественный состав биосубстанций предполагает создание препаратов разной направленности (пищевые добавки, препараты для бальнеологии, спортивной медицины, косметологии).

Из-за большого использования отечественными переработчиками крови пантовых оленей по сравнению с пантами нами изучен с применением современных методов биохимический состав вышеуказанного сырья (см. табл. 2).

В соответствии с данными таблицы 2 в биосубстанции из пантов по сравнению с кровью содержится больше общих и свободных аминокислот, общего количества макро- и микроэлементов, эстрадиола, инсулиноподобного фактора роста-1, инсулиноподобного фактора роста-2, бета-трансформирующего, эпидермального факторов роста, костного морфогенетического протеина-4.

В биосубстанции из крови преимущество по наличию общих незаменимых аминокислот, витаминов А, В2, В6, РР, фосфора, железа, магния, кобальта, селена, тестостерона, дегидроэпиандростерона, альфа-трансформирующего фактора роста, фактора роста нервов, цилиарного нейротрофического фактора, интерлейкинов-2 и 6.

Биосубстанции из пантов и крови маралов по видовому составу содержат идентичные органические и минеральные вещества, хотя их количество зависит от вида продукта, что предполагает создание препаратов с разными профилактическими и фармакологическими свойствами.

Разработав на первом этапе технологию переработки продукции пантового оленеводства в высококачественные субстанции с максимальной биодоступностью, мы взялись за совершенствование механизмов экстрагирования с целью получения оптимальных продуктов переработки.

Поскольку спиртовую и водную экстракцию пантов проводили с момента изобретения С.М. Павленко пантокрина, то в нашей работе изначально для экстракции применяли хвосты, половые органы самцов и эмбрионы маток, предварительно переработав их в биосубстанции по изложенной выше методике. Экстракции проводили при комнатной температуре.

Используя биосубстанцию из хвостов пантовых оленей, из трех испытанных вариантов водной экстракции, осуществленной с применением экстракта HASCOM JS-0099 при соотношении компонентов 1:2,5 и 1:5, температурных режимах 110, 116, 120 и 126 °C и экспозициях: 1,5;2,5;3,5 ч, выявили, что лучшим по результатам биохимического анализа оказался экстракт, приготовленный при соотношении компонентов 1:5, температуре 120 °C в течение 1,5–2,5 ч.

Спиртовые экстракты получали при соотношении компонентов 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, концентрации спирта 60, 70, 80 и 90%, экспозициях 48, 72 и 96 ч одно-, двух- и трехступенчатой экстракцией. Лучшим оказался вариант трехступенчатой экстракции, при этом на первом этапе соотношение компонентов составляло 1:6, концентрация спирта – 70%, экспозиция – 72 ч, на втором 1:4, 60% и 48 ч соответственно, на третьем 1:2; 50% и 24 ч соответственно. В последующем все экстракты объединяли.

Для отработки методики получения спиртовых экстрактов из плодов маток пантовых оленей также испытывались различные режимы. Соотношение спирта и сырья составляло от 2:1 до 7:1, крепость спирта от 50 до 90%, время экстрагирования от 1 до 5 суток и температура от 25 до 40 °C. По биохимическим показателям лучшим оказался спиртовой экстракт, приготовленный при следующем

соотношении: спирт : сырье 6:1, крепости спирта 50%, температуре 30...35 °C в течение от 72 до 96 ч. Из репродуктивных органов самцов лучшим был спиртовой экстракт при соотношении 1:4, концентрации спирта – 50% и длительности экстрагирования 72 ч.

Для усиления саногенетических и фармакологических свойств проведены исследования по созданию комплексных биосубстанций из продукции пантового оленеводства. Для этой цели порошковые биосубстанции смешивали в разных сочетаниях друг с другом, а экстракции проводили не только при комнатной температуре, но и при температуре 100–120 °C или в поле ультразвука, разной длительности с водой или раствором спирта. Поскольку в предыдущих исследованиях при водной и спиртовой экстракции выход сухих веществ в зависимости от биосубстанции был не более 7–10%, в последующих экспериментах этот факт стал, наряду с биологическими свойствами экстрактов, одним из определяющих.

Создание комплексных биологических субстанций из продукции пантового оленеводства способствует объединению всех биологически активных веществ, усиливая биологические свойства препаратов. Из 14 испытанных вариантов полученных биосубстанций, приготовленных по принципу пантокрина, по биохимическим показателям и биологической активности оптимальными были биосубстанции из пантов и половых органов самцов, пантов и сухожилий, пантов и зародышей. Лучший водный экстракт был из хвостов + половых органов самцов.

При использовании высокотемпературной или ультразвуковой экстракции продукции пантового оленеводства выход сухих веществ их хвостов составил соответственно 18,6–26,0%, зародышей – 3,2–5,4%, половых органов самцов – 4,1–13,7, сухожилий – 24,6–54,4. Выход зависит от времени экстрагирования и способа, выше в поле ультразвука при более длительном процессе.

Кровь пантовых оленей, как и панты, относится к восстанавливаемой продукции по сравнению с другой второстепенной продукцией. Совершенствование ее переработки и использования сводилось или к сушке с применением современного оборудования, или к улучшению качества жидкой формы. Изначально изучили биохимический и гормональный состав крови в зависимости от вида оленей, их пола, возраста, сезона года, физиологического состояния, что

было также сопряжено с длительными опытами и экспериментами. В последующем отработывали методики забора крови (цельная, дефибрированная, стабилизированная). Выяснив, что при дефибрировании потери составили свыше 30%, отработали методики взятия цельной крови с последующим диспергированием в изначальную субстанцию. Сейчас нами запатентована техника изготовления жидкого пантогематогена с применением «цитросепта грейпфрукового» вместо спирта, глюкозы – вместо сахара и пастеризация готового продукта не водяной баней, а СВЧ-энергией. На основе пантогематогена изобретены обогащенные гистолизатами из побочной продукции пищевые добавки, полученные биотехнологическими методами.

Учитывая, что при водной и спиртовой экстракции в раствор переходит всего лишь от 7 до 10% сухих веществ, а измельчение сырья и его смешивание с порошками трав с последующим заключением в лекарственную форму – слишком примитивный способ переработки, причем полученный продукт низкого качества, институт разработал технологию производства из всей продукции пантового оленеводства как гистолизатов, так и растворимых концентратов путем ферментации сырья растительными, бактериальными и микозными ферментами в поле ультразвука.

Отработку техники получения гистолизатов с применением биотехнологических методов первоначально провели на пантах маралов и северных оленях, используя для этих целей целые консервированные или сырые панты, или различные части пантов (комель, середина, верхушка). Апробированы различные виды и дозировки используемых ферментов: сначала поджелудочная железа крупного рогатого скота, затем папаин. Запатентован метод получения пантолизатов с выходом сухого вещества не более 25%. Поскольку стоимость продукта в данном случае зависит от выхода (чем больше выход, тем меньше стоимость), полученный продукт нас не удовлетворял. В последующем мы совершенствовали технологию получения гистолизатов, контролируя качество полученных биосубстанций биохимическими и биологическими исследованиями. Используя из пантов порошковую биосубстанцию, проводя двухступенчатую ферментацию с папаином и пепсином, с последующей высокотемпературной экстракцией жмыха, мы получили выход сухого вещества на уровне 42–45%. Полученные по запатенто-

ванной технологии гистоллизаты высушивали, превращая в растворимые концентраты пантов. Перенеся эту технологию на всю второстепенную продукцию пантового оленеводства, мы получили результаты, примерно аналогичные пантам.

Для усовершенствования технологии переработки продукции пантового оленеводства, преследуя аналогичные задачи и цели, мы апробировали для ферментации пантов маралов бактериальную и грибную протеазы, полученные во Всероссийском НИИ пищевой биотехнологии, в тех же условиях. Поскольку результат на пантах оказался неплохим (выход 64%), эту технологию мы испытали на второстепенной продукции.

Таблица 3

Выход концентратов из продукции пантового оленеводства
с применением ферментов

Вид сырья	Растительные и животные ферменты	Ферменты НИИ пищевой биотехнологии	Ферменты коммерческие
Панты	42,0	65,0	73,8
Хвосты	26,0	81,3	98,0
Репродуктивные органы самцов	13,2	39,8	65,2
Матки с эмбрионами	46,0	64,7	75,3
Сухожилия	51,2	61,3	71,0
Мясо	63,4	94,1	98,4
Кожа пантов	65,2	93,4	97,2
Шкура	64,3	95,2	97,5

По разработанной технологии водной экстракции побочного сырья маралов выход сухих веществ из хвостов увеличился до 80,0%, репродуктивных органов самцов – до 40,0, маток с зародышами и околоплодной жидкостью – до 18,3, сухожилий – до 60,0, мяса – до 54,0 и кожи пантов до 64,0%. Растворимость анализируемых концентратов составила 95,0...98,0%.

Применяя для ферментации препараты промышленного производства на основе *Bacillus* протеазы Протамекс, выпускаемый фир-

мой «Novozymes» в Дании; щелочную грибную протеазу Протеаза 1, щелочную бактериальную протеазу на основе *Bacillus licheniformis* Протеаза 2; комплекс кислых протеаз на основе *Penicillium canescens* Протомикс; фермент на основе *Bacillus subtilis*, нам удалось переработать продукцию пантового оленеводства на 65,2–98,4% в растворимые концентрации с высокой биологической активностью (табл. 3.).

В целях обогащения гистолизатов из побочной продукции пантового оленеводства витаминами, полифенолами, сахарами, макро- и микроэлементами отработана новая биотехнология, где в качестве экстрагентов взяты соки местных плодовых культур (яблоня, облепиха, смородина, вишня). Более подробная информация и представленные результаты исследований изложены в соответствующих монографиях и патентах РФ.

Выводы

1. Применение вакуумной, инфракрасной сушек, СВЧ-энергии для консервирования продукции пантового оленеводства позволяет сократить длительность процесса высушивания по сравнению с традиционными методами и получать высококачественные субстанции в готовом порошкообразном состоянии без дополнительных трудозатрат.
2. Биосубстанции из основной (панты) и второстепенной продукции (мясо, кровь, хвосты, жилы, половые органы, зародыши, кожа) по видовому составу содержат идентичные органические и минеральные вещества, причем по большинству из них преимущество имеет второстепенная продукция. Разнокачественность по биохимическому составу и биологической активности биосубстанций из продукции пантового оленеводства предполагает создание препаратов различной профилактической и фармакологической направленности.
3. Используя общепринятые методы спиртовой и водной экстракции продукции пантового оленеводства, как моно-, так и полибиосубстанции, удалось достичь выхода сухих веществ 7–10% при оптимальном биохимическом составе и биологической активности экстрактов. При высокотемпературной экстракции или в поле ультразвука в зависимости от вида биосубстанции и режимов процесса выход составил 32–51,4%, а при ферментативном гидролизе – до 98,4%.

4. С целью получения универсальных растворимых биосубстанций из продукции пантового оленеводства мы запатентовали универсальную технологию с применением ферментативного гидролиза в поле ультразвука, позволяющую получать растворимые концентраты с качественными биохимическими составами и высокой биологической активностью.

Библиографический список

- Александров В.В., Кудрявский С.И. Лечебно-профилактическое использование продуктов пантового оленеводства. Барнаул, 2003. 126 с.
- Богачев А.С., Богачев С.А. О сырье народной медицины – желчи, пантах, жирах и другом. Уссурийск, 1993. 113 с.
- Кузнецов Б.А. Товароведение второстепенных видов животного сырья. М., 1947. 379 с.
- Луницын В.Г. Пантовое оленеводство России / РАСХН, Сиб. отд-ние ВНИИПО. Барнаул, 2004. 582 с.
- Луницын В.Г. Способы консервирования, переработки и экстракции продукции пантового оленеводства / ВНИИПО. Барнаул, 2014. 227 с.
- Луницын В.Г., Луницына Ю.В. Второстепенная продукция пантового оленеводства в оздоровительной практике // Проблемы пантового оленеводства и пути их решения. Барнаул, 2013. Т. 7. С. 51–57.
- Луницын В.Г., Луницына Ю.В. Использование крови пантовых оленей в зарубежной и отечественной практике // Проблемы пантового оленеводства и пути их решения. Барнаул, 2013. Т. 7. С. 40–51.
- Луницын В.Г., Луницына Ю.В. Использование пантов в Российской Федерации // Проблемы пантового оленеводства и пути их решения. Барнаул, 2013. Т. 7. С. 26–35.
- Маракуев А.В., Рудаков А.В. Пятнистый олень в китайской фармакопее // Вестник Дальневосточного филиала АН СССР. 1935. № 11. С. 77–104.
- Размахнин В.Е., Соковых С. Хвостовая железа пантовых оленей // Охота и охотничье хозяйство. 1977. № 1. С. 18–19.

УДК 581.143.6

Е.С. Плющёва¹, О.В.Бычкова¹, Л.П.Хлебова¹, Е.В. Орлова²

¹Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
(Москва, Россия)

Технология получения генетически модифицированных корней *Tagetes patula*

Представлены данные по оценке эффективности различных способов инокуляции *in vitro* *Tagetes patula* почвенными агробактериями *Agrobacterium rhizogenes*. Установлено, что наиболее эффективным методом инфицирования бархатцев отклоненных является кратковременное кокультивирование стерильных листовых эксплантов и агробактерий в жидкой питательной среде.

Ключевые слова: культура *hairy roots*, *Tagetes patula*, почвенная агробактерия, эксплант.

Культура *hairy roots* («бородатые корни»), полученная *in vitro* с помощью почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes*, является относительно новым источником получения БАВ растений. Технология основана на природном явлении, проявляющемся в неконтролируемом разрастании и ветвлении корневой системы (Roychowdhury et al., 2013). Генетическая трансформация достигается за счет встройки *rolB* генов с помощью Ri-плазмиды *A. rhizogenes* в геном растительной клетки (Кузовкина, Вдовитченко, 2011; Bulgakov et al., 2012).

Существуют разные способы проведения генетической трансформации *in vitro*. Одним из них является обработка семян нужным штаммом агробактерий в определенной концентрации перед их проращиванием на питательной среде (Marchev et al., 2011). Другой способ состоит в обработке надрезанных скальпелем или проколотых иглой растительных эксплантов суспензией агробактерий (Van de Velde et al., 2003). Также применяют метод так называемой шприцевой инъекции: на экспланте делают прокол иглой, через которую

в растительную ткань вводят определенный объем бактериальной суспензии (Estrada-Navarette et al., 2007). Еще один метод заключается в помещении части питательного агара с бактериальным газоном внутрь разреза гипокотеля (Yibrah et al., 1996).

Цель данной работы – подбор наиболее эффективного способа инокуляции *in vitro* *T. patula* почвенными агробактериями.

Материалы и методы. Объектом исследования служили стерильные проростки и экспланты *Tagetes patula* L. Для получения стабильно растущих культур генетически модифицированных корней бархатцев нами использовано два способа генетической трансформации – непосредственная инокуляция стерильных проростков без извлечения их из пробирок и совместное культивирование изолированных растительных эксплантов с суспензией бактерий. При проведении трансформации использовали два штамма *A. rhizogenes*: дикий штамм 8196RT и модифицированный штамм A-4в. В качестве питательной среды для ризогенеза использовали безгормональную среду MS, содержащую 500 мг/л цефотаксима и 25 г/л сахарозы. Культивирование эксплантов происходило в темноте при температуре 24–25 °С. Наблюдения за культурами проводили в течение трех недель. Отмечали время индукции ризогенеза, скорость роста корней, интенсивность их ветвления.

Результаты и их обсуждение. Инокуляция стерильных проростков. В течение всего эксперимента наблюдали существенные различия по интенсивности образования и скорости роста корней. Первые признаки корневых культур на растеньицах бархатцев при использовании штамма 8196RT появились на 3–4-й день культивирования. Корни отрастали беспорядочно, по всей поверхности стебля, хорошо ветвились. Индукция ризогенеза при заражении проростков штаммом A4в происходила несколько позже, через 4–5 суток.

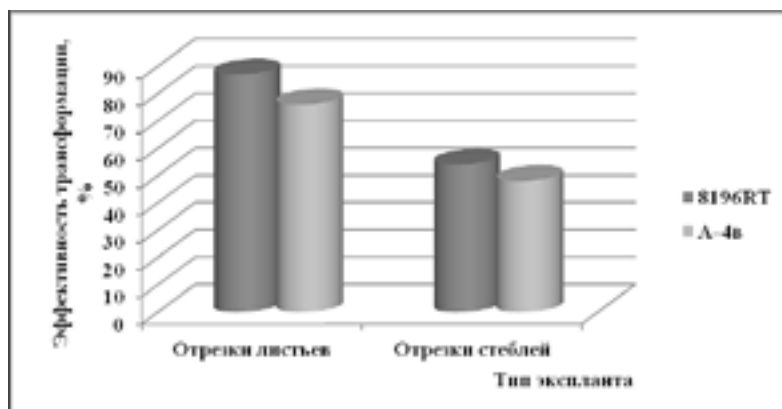
Более высокая интенсивность роста корней, зараженных штаммом 8196RT, сохранялась на протяжении всего эксперимента. Каждую неделю происходило многократное увеличение как их числа, так и длины. К концу 3-й недели культура занимала всю площадь дна 100 мл колбы.

Заражение штаммом A4-в также имело успех, однако по времени проявления ризогенеза и по скорости роста модифицированные

корни существенно отставали. После трехнедельного культивирования ризогенная композиция визуально существенно отличалась от культуры, полученной при заражении штаммом 8196RT. Это касалось как плотности корневого «мата», так и площади распределения корневой массы.

Таким образом, описанный способ проведения генетической трансформации с использованием стерильных проростков *T. patula* оказался успешным для получения *in vitro* хорошо сформированной корневой культуры. Заражение объекта штаммом 8196RT имело преимущество в сравнении со штаммом А4-в как по времени индукции ризогенеза, так и скорости роста и интенсивности ветвления корней. Однако перевод образовавшихся *hairy roots* бархатцев отклоненных на жидкую питательную среду, не содержащую гормонов, для дальнейшего культивирования на качалке не увенчался успехом. При их отделении от твердой среды и помещении в жидкую среду не происходила адаптация к росту в условиях погружения, корни прекращали рост и погибали. Причиной неудачи, вероятно, явились сложности, связанные с деконтаминационными процессами при переводе полученных корневых инокулятов в жидкую среду. Интенсивный рост корневых культур после их отделения от маточного растения возможен при полном элиминировании источника инфекции, что, как правило, достигается добавлением антибиотика (Кузовкина, Вдовитченко, 2011). Подбор его концентрации и схемы применения является отдельной методической задачей. Поэтому данный эксперимент требует специального дизайна и будет продолжен нами в дальнейшем.

Инокуляция изолированных растительных эксплантов. Данный способ является наиболее часто используемым для получения «бородатых» корней растений в лабораторных условиях. Метод заключается в кратковременном совместном культивировании стерильных растительных эксплантов и агробактерий в жидкой питательной среде. Заражали два типа эксплантов *T. patula* – отрезки листьев и стеблей асептических растений, выращенных *in vitro*. С целью ранения экспланты накалывали тонкой иглой шприца, заполненного бактериальной суспензией. Результаты трансформации представлены на рисунке.



Эффективность трансформации *in vitro* различных эксплантов *Tagetes patula* L. при совместном культивировании с *Agrobacterium rhizogenes* ($HCP_{0,05} = 5,4$)

Первые признаки корневых культур на эксплантах бархатцев при использовании штамма 8196RT проявились на 2-й день после кратковременного совместного культивирования. Максимальный уровень ризогенеза наблюдали при заражении отрезков листьев, отделенных от асептически размноженных растений в культуре *in vitro*. Образующиеся корни хорошо ветвились, формируя характерную ризогенную композицию. Успех трансформации при заражении штаммом 8196RT достигал 90%. Эффективность использования штамма А-4в в качестве источника инфекции почти на 10% оказалась ниже предыдущего варианта.

Частота трансформации отрезков стеблей существенно уступала, независимо от типа штамма, составляя 54 и 48% при инокуляции штаммами 8196RT и А-4в соответственно. При этом корневая культура отличалась слабым ветвлением и низкой скоростью роста.

Согласно литературным данным, большинство растительных структур, таких как гипокотиль, лист, стебель, черешок, побег, семядоли, протопласты, корни, клубни, способны к генетической трансформации при инфицировании почвенной агробактерией, что приводит к индукции и развитию бородатых корней (Tanaka et al., 1994; Logemann, 2006; Estrada-Navarette et al., 2007; Лешина, 2011; Marchev et al., 2011; Grech-Baran et al., 2014; Олина и др., 2016). Однако при

этом эффективность трансформации может существенно различаться в зависимости как от вида растения, так и типа экспланта. В нашем эксперименте использование двух типов эксплантов *T. patula* обусловило разный уровень ризогенеза, подтверждая необходимость выполнения исследований по подбору объекта инфицирования. Последующий перевод полученных корневых культур в жидкую среду обеспечил получение хорошо растущих линий.

Заключение. Таким образом, наиболее эффективным методом инфицирования *T. patula* является кратковременное кокультивирование стерильных листовых эксплантов и агробактерий в жидкой питательной среде.

Библиографический список

Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю. Генетически трансформированные корни как модель изучения физиологических и биохимических процессов корневой системы целого растения // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 5. С. 787–796.

Лешина Л.Г. *Agrobacterium rhizogenes* – опосредованная трансформация и регенерация двух видов растений из семейства Аросупасеae // Физиология и биохимия культурных растений. 2011. Т. 43, № 6. С. 533–539.

Олина А.В., Орлова Е.В., Степанова А.Ю. Получение *hairy roots* Родюлы холодной // Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность : сборник статей по материалам VI Всероссийского симпозиума (16–21 ноября 2016 г., Москва). М., 2016. С. 154–156.

Bulgakov V.P., Gorpenchenko T.Y., Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Tchernoded G.K., Bulgakov D.V., Aminin D.L., Zhuravlev Y.N. The rolB gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense // Plant Physiology. 2012. Vol. 158. P. 1371–1381. DOI: 10.1104/pp.111.191494.

Estrada-Navarette G., Alvado-Affantranger X., Olivares J.E., Guillen G. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes* // Nat. Protoc. 2007. Vol. 2. P. 1819–1824.

Grech-Baran M., Sykłowska-Baranek K., Krajewska-Patan A., Wyrwał A., Pietrosiuk A. Biotransformation of cinnamyl alcohol to rosavins by

non-transformed wild type and hairy root cultures of *Rhodiola kirilowii* // Biotechnol. Lett. 2014. Vol. 3. P. 649–656.

Logemann E. An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol // Plant Methods. 2006. Vol. 2. No. 16. P. 16–22.

Marchev A., Georgiev V., Ivanov I., Badjakov I., Pavlov A. Two-phase temporary immersion system for *Agrobacterium rhizogenes* genetic transformation of sage (*Salvia tomentosa* Mill.) // Biotechnol. Lett. 2011. Vol. 33. P. 1873–1878.

Roychowdhury D., Majumder A., Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: prospects and challenges // Biotechnology for Medicinal Plants / ed. By S. Chandra et al. Berlin Heiderberg : Springer-Verlag, 2013. P. 29–68. DOI: 10.1007/978-3-642-29974-2_2

Tanaka N., Takao M., Matsumoto T. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and regeneration of *Vinca minor* L. // Plant Tiss. Cult. Lett. 1994. Vol. 11. No. 3. P. 191–198.

Van de Velde W., Karimi M., Den Herder G., Van Montagu M., Holsters M., Goormachtig S. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of plants // Genetic transformation of plants. Berlin, 2003. P. 23–44.

Yibrah H.S., Gronroos R., Lindroth A., Franzen H. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated introduction of adventitious rooting from *Pinus contorta* hypocotyls and the effect of 5-azacytidine on transgene activity // Transgenic Res. 1996. Vol. 5. P. 75–85.

УДК: 579.64

Н.Ю. Сперанская, И.Ю. Евдокимов

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Изучение стабильности биоконсерванта для заготовки зеленой массы кормов для сельскохозяйственных животных в процессе хранения

Описаны результаты испытания стабильности биоконсерванта для заготовки зеленой массы кормов в процессе хранения по показателю токсичность. Исследования проводились экспресс-методом на стилонихиях в течение 12 месяцев. Полученные результаты вошли в досье для государственной регистрации созданного биопрепарата.

Ключевые слова: биологический консервант, корма для сельскохозяйственных животных, токсичность, биотестирование, стилонихии, экспресс-методы.

Введение. В животноводстве широко используются корма, заготавливаемые из зеленой массы с использованием биологических и химических консервантов. На сегодняшний день биоконсерванты в сухой форме как наиболее удобные и безопасные на рынке Российской Федерации представлены только зарубежными производителями. Создание и массовое производство отечественных аналогов является одной из приоритетных задач современной микробиологии. С 2015 по 2018 г. в рамках Соглашения о предоставлении субсидии №14.580.21.0006 от 15 октября 2015 г. в Инжиниринговом центре Промбиотех АлтГУ разрабатывался биоконсервант в лиофилизированной форме для заготовки зеленой массы кормов для сельскохозяйственных животных.

Одним из наиболее важных этапов внедрения вновь создаваемых микробиологических препаратов в промышленное производство является государственная регистрация. Для этого составляется досье, в котором содержится информация о различных характеристиках

биопрепарата, в том числе о его стабильности в процессе хранения. Один из показателей нарушения стабильности – это появление токсичности. Таким образом, целью проведенной работы являлось изучение качества по показателю токсичность биоконсерванта в лиофилизированной форме в процессе хранения.

Материалы и методы. Материалами исследования послужили три экспериментальные партии биоконсерванта. Биологический консервант в лиофильно высушенной форме содержит молочнокислые и пропионовокислые бактерии *Lactobacillus plantarum* BKM B-3055D, *Lactococcus lactis subsp lactis* BKM B-3056D, *Propionibacterium acidipropionici* BKM Ac-2769D в соотношении 4:4:2 соответственно, выращенные на соответствующих питательных средах, высушенные в смеси с криопротекторной средой. В 1 г биологического консерванта содержится *Lactobacillus plantarum* и *Lactococcus lactis subsp lactis* не менее $4,0 \times 10^{11}$ КОЕ/г, *Propionibacterium acidipropionici* не менее $2,0 \times 10^{11}$ КОЕ/г. Наполнитель – сухая молочная сыворотка.

Для определения общей токсичности продуктов микробиологического синтеза возможно использование экспресс-методов (ГОСТ 31674-2012 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности), позволяющих в течение 1,5–3 часов провести биотестирование кормов на инфузориях (стилонихиях). Метод основан на извлечении из исследуемого препарата различных фракций токсических веществ параллельно ацетоном и водой с последующим воздействием этих экстрактов на стилонихий. Оценку результату биотеста дают по реакции гибели инфузорий.

Для проведения испытаний использовались микробиологические предметные стекла с отшлифованной лункой вместимостью $0,2 \text{ см}^3$.

При приготовлении рабочего раствора питательной среды для культивирования стилонихий и разбавления ацетоновых экстрактов образцов использовался раствор Лозина-Лозинского следующего состава: NaCl – 0,01%, KCl – 0,001%, CaCl_2 2-водный – 0,001%, MgCl_2 6-водный – 0,001%, NaHCO_3 – 0,002%. В качестве модельного токсиканта использовался раствор сернистой меди рабочей концентрации $0,1 \text{ мг/дм}^3$.

Для приготовления водного раствора ацетонового экстракта брали навеску биоконсерванта массой $10 \pm 0,1 \text{ г}$, помещали в про-

бирку с пришлифованной пробкой вместимостью 25 см³ и заливали 15 см³ ацетона. После энергичного встряхивания в течение двух минут полученный раствор отстаивают не менее 10 мин. Надосадочную жидкость экстракта отбирают автоматической пипеткой 0,5 см³ и переносят в химический стакан с водным раствором Лозина-Лозинского (40 см³).

При приготовлении водного экстракта биоконсерванта брали навеску массой $10 \pm 0,1$ г вносили в колбу вместимостью 250 см³ и заливали 100 см³ дистиллированной воды. Колбы с содержимым встряхивали на аппарате в течение 20 мин, после чего центрифугировали с частотой вращения 1000 об./мин в течение 5 мин и отделяли надосадочную жидкость.

Каждую пробу биоконсерванта исследовали в пятикратной повторности. Пересадку и подсчет стилонихий проводили под микроскопом МБС-10 при увеличении 2×14 . В лунку предметного стекла помещали 20 мкл среды со стилонихиями и 20 мкл водного раствора ацетонового экстракта исследуемой пробы биопрепарата. Через 2 мин в каждой лунке подсчитывали количество стилонихий. Полученные данные заносили в журнал. После подсчета стилонихий в каждую лунку вносили по 200 мкл водного раствора ацетонового экстракта и засекали время. Токсичность исследуемого корма определяли по выживаемости стилонихий через 1 ч (при экстракции ацетоном) и 3 ч (при экстракции водой) экспозиции. В случае токсичности исследуемого корма стилонихии: а) изменяют свою обычную вытянуто-овальную форму на округлую, а движение – на беспорядочное с поворотом вокруг своей поперечной оси; б) прекращают движение и (или) подвергаются распаду – лизису. Выживаемость стилонихий в процентах вычисляли по формуле: $N = (N_2 : N_1) \times 100$, где N_2 – среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества стилонихий в конце опыта, шт.; N_1 – среднеарифметическое (из пяти испытаний) значение количества стилонихий в начале опыта, шт.; 100 – перевод результата в проценты. Токсичность исследуемого определяют из расчета: 70–100% выживаемости стилонихий – биоконсервант нетоксичный; 40–69% выживаемости стилонихий – биоконсервант слаботоксичный; 0–39% выживаемости стилонихий – биоконсервант токсичный. Нетоксичным следует считать

образец биопрепарата, определенный нетоксичным при параллельном биотестировании как водного раствора ацетонового экстракта, так и водного раствора испытуемого биопрепарата.

Результаты и их обсуждение. Исследования биоконсерванта на токсичность проводились в ежемесячно в течение 12 месяцев. Препарат хранили в закрытой упаковке при температуре 25 °С. Значения результатов исследования представлены в таблице.

Выживаемость стилонихий
при воздействии ацетонового экстракта биоконсерванта

Номер серии	Значение выживаемости стилонихий, %					
	2016					
	11.07	12.08	13.09	14.10	11.11	17.12
050616	95,8	95,4	94,8	92,5	92,1	91,5
060616	93,7	93,5	92,8	92,9	92,7	90,3
070616	94,5	94,3	93,7	92,2	92,0	91,6
Номер серии	2017					
	13.01	06.02	14.03	10.04	15.05	12.06
050616	90,4	85,1	86,7	85,1	84,8	84,1
060616	90,1	88,6	88,4	87,4	85,9	85,5
070616	90,9	87,4	87,0	86,1	84,4	83,8

Как видно из таблицы, выживаемость стилонихий при воздействии ацетонового экстракта биоконсерванта во всех трех образцах очень высокая. Между образцами отличия незначительные и составляют 0,3–2,1%. В процессе хранения выживаемость стилонихий уменьшилась в разных образцах на 8,2–11,7%. Влияние ацетонового экстракта с 7 по 12 месяц хранения возросло в два раза. Тем не менее все значения выживаемости стилонихий свидетельствуют об отсутствии токсичности исследуемого биоконсерванта.

При исследовании воздействия водного экстракта биоконсерванта выживаемость стилонихий составила 100% и в течение срока хранения не изменялась.

Выводы. Контроль качества по показателю токсичность препарата в процессе хранения проводился ежемесячно в течение срока хранения. Биотестирование проводилось параллельно как водным раствором ацетонового экстракта, так и водным раствором экстракта испытуемого биопрепарата. Установлено, что при хранении препарата в течение 12 месяцев при температуре 25 °С биоконсервант в лиофильно высушенной форме остается нетоксичным.

УДК 633.11:58.032.3:58.085

**А.М. Титова, Л.П. Хлебова, О.В. Бычкова, В.А. Петин,
М.А. Красилов**

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Роль осмолитов в осмотической регуляции мягкой пшеницы в условиях индуцированного стресса *in vitro*

Изучена роль осмолитов в осмотической регуляции яровой мягкой пшеницы в условиях недостатка влаги. Установлено, что экзогенные осмолиты способны индуцировать механизмы осмотической адаптации на клеточном уровне. Выявлено влияние различных концентраций хлорида калия и хлорида кальция на плазмолиз цитоплазмы пыльца при воздействии осмотического стресса. Хлорид кальция оказывает более выраженное влияние на восстановление тургора клеток в сравнении с KCl.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, пыльца, осмотический стресс, полиэтиленгликоль 6000, цитоплазма, плазмолиз, осмолит.

Введение. Дефицит влаги является одним из основных ограничений в реализации продуктивности растений (Крупнов, 2011). В Алтайском крае сельскохозяйственные земли подвержены постоянному или частому дефициту воды, что может привести к частичной

либо полной потере урожая. Так, например, при раннелетней засухе 2010 г. снижение урожайности яровой мягкой пшеницы составило 34%, а при длительной – в 2012 г. – до 78% (Лепехов, Коробейников, 2013; Лепехов, 2015). Эффективное растениеводство в нашем регионе возможно лишь на базе адаптированных к местным условиям засухоустойчивых сортов. Стратегии селекции на устойчивость к засухе требуют решения ряда ключевых проблем: определение механизмов реагирования сортов на изменение условий среды; подбор источников необходимых признаков и свойств; нахождение эффективных методов оценки селекционного материала (Сигнаевский и др., 2014).

Одним из важных механизмов засухоустойчивости является осмотическая адаптация (ОА), т.е. снижение осмотического потенциала клетки за счет накопления растворенных веществ – осмолитов (Blum, 2017). Целью данной работы являлось оценка роли осмолитов в осмотической регуляции мягкой пшеницы в условиях индуцированного стресса.

Материалы и методы. Объектом исследования служила модельная группа сортов яровой мягкой пшеницы с известной полевой устойчивостью к засухе. Для оценки реакции генотипов на воздействие осмотического стресса использовали пыльцу, отобранную в поле с цветущих колосьев в летний период 2017 г. Пыльцу культивировали в чашках Петри на предметных стеклах в капле осмотика, имитирующего засуху. Индуктором осмотического стресса служил полиэтиленгликоль (ПЭГ) в концентрации 55%. В качестве контроля использована среда, содержащая 30% ПЭГ (Patil, Ravikumar, 2011). Роль осмолитов исследована при экзогенное действие двух веществ – KCl и CaCl₂, которые добавляли в систему оценки в концентрации 5, 10 и 15 mM. Анализ проводили на световом микроскопе OlympusBX51. Оценивали плазмолитические явления цитоплазмы в контроле и в условиях осмотического стресса, а также при добавлении осмолитов. Для статистической оценки использовали корреляционный, дисперсионный и регрессионный анализы.

Результаты и обсуждение. Нами установлено, что действие осмотика (55% ПЭГ) на пыльцевые зерна приводит к достоверному различию площади их цитоплазмы как относительно контроля (30% ПЭГ), так и между отдельными генотипами. При этом изученные об-

разцы характеризовались различными сценариями поведения. Три сорта практически не реагировали на действие стресс-фактора (Тарская 10, Челябинская юбилейная и Свирель), два – существенно снижали показатель (Новосибирская 31 и Омская 24), и два – обнаруживали стимулирующий эффект после погружения в 55% полиэтиленгликоль (Новосибирская 29 и Алтайская 100).

При добавлении в среду культивирования 5% хлорида калия у всех генотипов, за исключением сорта Челябинская юбилейная, происходило более или менее выраженное увеличение площади цитоплазмы, что указывает на активное накопление данного осмолита. Исходя из разных стратегий поведения сортов в предлагаемых нами условиях можно заключить, что разные генотипы, вероятно, используют различные варианты осмотической настройки. Изменение тургора клеток при культивировании в растворе осмотика (55% ПЭГ) можно рассматривать как «внутреннюю» осмотическую настройку за счет мобилизации внутриклеточных осмолитов. В то время как положительный отклик на экзогенное добавление этих веществ (в нашем эксперименте хлорид калия) свидетельствует об «индуцированной» осмотической адаптации и активном поступлении ионов из окружающей среды. Попарное сравнение различных типов регуляции методом регрессионного анализа показало наличие положительной корреляции между общей и индуцированной адаптацией, ее отсутствие между внутренней и общей и отрицательную зависимость между индуцированной и внутренней осмотической настройкой.

Следовательно, культивирование пыльцы в среде, содержащей KCl в концентрации 5 mM, индуцирует механизм адаптации к дефициту влаги, который является преобладающим в общей осмотической регуляции. Увеличение концентрации хлорида калия до 10 и 15 mM в среде культивирования приводило к постепенному увеличению площади цитоплазмы пыльцы по сравнению с осмотическим стрессом.

Аналогичный опыт был проведен по изучению влияния другого осмолита – хлорида кальция – на свойство пыльцы поддерживать клеточный тургор в условиях засухи. При добавлении CaCl_2 в концентрации 5 mM у 5 образцов наблюдали увеличение площади цитоплазмы до 18%, что также указывает на механизм индуцированной

осмотической регуляции за счет поглощения ионов извне. Подтверждением данного вывода является сравнение линий регрессии различных типов осмотической настройки. Высокий коэффициент детерминации, равный 63%, обусловил тесную положительную корреляцию между общей и индуцированной адаптацией, что указывает на ее преобладающий эффект в формировании механизма засухоустойчивости.

Повышение концентрации хлорида кальция до 15 mM инициировало более интенсивное поступление ионов внутрь клеток, что приводило к увеличению площади цитоплазмы до 130% относительно контроля.

Сравнение разных осмолитов показало более выраженное воздействие хлорида кальция. Так, например, у сорта Новосибирская 29 положительный эффект данного вещества вырос почти на 25% в сравнении с воздействием хлорида калия, а у Омской 24 восстановление тургора клеток после негативного влияния осмотика проходило более активно на 15%. Полагаем, что это можно объяснить многофункциональной деятельностью кальция в защитных реакциях клеток на действие стрессов различной природы, в том числе дефицита влаги. Так, например, известна его способность обеспечивать термостабильность белков, участвовать в регуляции и элиминации активных форм кислорода, активации деятельности антиоксидантов и синтезе стрессовых белков и пролина (Колупаев, 2007).

Таким образом, экзогенные осмолиты играют роль в индукции механизмов осмотической настройки яровой мягкой пшеницы на клеточном уровне, что способствует повышению засухоустойчивости. Хлорид кальция оказывает более выраженное влияние в сравнении с KCl. Повышение концентрации осмолитов приводит к увеличению тургора клеток при воздействии осмотического стресса. Лабораторная оценка пыльцы позволяет проводить дифференциацию генотипов по устойчивости к засухе.

Библиографический список

Колупаев Ю.Е. Кальций и стрессовые реакции растений // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 2007. Вип. 1 (10). С. 24–41.

Крупнов В.А. Засуха и селекция пшеницы: системный подход // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 1. С. 12–23.

Лепехов С.Б. Некоторые принципы селекции яровой мягкой пшеницы на засухоустойчивость и урожайность в Алтайском крае. Барнаул, 2015. 150 с.

Лепехов С.Б., Коробейников Н.И. Полевая и агрономическая засухоустойчивость сортов мягкой пшеницы в условиях лесостепи Алтайского края // Вестник Алтайского гос. аграрного университета. 2013. № 1 (99). С. 9–12.

Сигнаевский В.Д., Степанов С.А., Болдырев В.А. Влияние засухи на продуктивность яровой мягкой пшеницы // Известия Саратовского университета. Серия: Химия. Биология. Экология. 2014. Т. 14, вып. 2. С. 50–54.

Blum A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production // Plant, Cell and Environment. 2017. Vol. 40. P. 4–10.

Patil B.S., Ravikumar R.L. Osmotic adjustment in pollen grains: a measure of drought adaptation in sorghum // Current Science. 2011. N 100(3). P. 377–382.

УДК 633.11:581.143.6:58.086

Л.П.Хлебова¹, О.В. Бычкова¹, М.А. Розова², А.И. Зиборов²

¹Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

²Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий (Барнаул, Россия)

Гистологические особенности морфогенных каллусов яровой твердой пшеницы

Изучены цито-гистологические особенности каллусных культур яровой твердой пшеницы зародышевого происхождения. Установлено, что присутствие в питательной среде осмотического стресса,

вызванного добавлением 1,3% NaCl, приводило к замедленному росту и существенному снижению регенерационного процесса в формирующихся каллусах. Причиной являлось снижение интенсивности клеточной дифференциации, что тормозило формирование морфогенетических очагов.

Ключевые слова: твердая пшеница, эксплант, зрелый зародыш, каллус, морфогенетический очаг, осмотический стресс.

Введение. Известно, что использование селективных систем *in vitro*, имитирующих в питательной среде различные стрессы, в том числе осмотического характера, осложняют успешное протекание морфогенных процессов (Pellegrineschi et al., 2004; Никитина и др., 2014; Ерещенко и др., 2015). Следовательно, результаты цито-гистологических исследований каллусов, формирующихся на фоне действия стресс-фактора, имеют большое значение для понимания особенностей формирования морфогенетических очагов и реализации морфогенных компетенций клеток в условиях развивающегося стресса.

Материалы и методы. Эксплантами для индукции каллусов служили зрелые зародыши яровой твердой пшеницы сорта Памяти Янченко. Семена стерилизовали путем погружения в 70% этанол на 3 мин, затем материал переносили в 2% раствор лизоформина-3000 на 15 мин, далее трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

Зрелые зародыши, выделенные асептически, помещали щитком вверх на питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (МС) с полным набором макро- и микросолей, содержащую 0,7% агара, 3% сахарозы и 2 мг/л 2,4-Д. Клеточные культуры выращивали в темноте при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Для индукции морфогенеза часть каллусов в течение 30 суток каждые 5 дней пассировали на дифференцирующую среду того же состава минеральных веществ и витаминов, дополненную 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Культивирование осуществляли на свету при 16-часовом фотопериоде (день) и температуре 22–24 °C. Параллельно был выполнен аналогичный эксперимент на питательных средах, содержащих в качестве осмотического

стрессора 1,3% хлорида натрия. Анализ постоянных цитологических препаратов каллусных культур (Круглова, Батыгина, 2002) проводили при помощи светового микроскопа OlympusBX51.

Результаты. Для оценки морфогенетических потенций формирующихся каллусных структур проводили подсчет морфогенетических очагов как необходимого этапа закладки различных органов и формирования растений-регенерантов. При культивировании *in vitro* зрелых зародышей, инокулированных на питательную среду, содержащую 1,3% хлорида натрия, через 5–7 суток наблюдали формирование рыхлых обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, представленных рыхло расположенными клетками с большими межклетниками, ядра в которых отсутствуют. Каллус характеризовался чрезвычайно низкой скоростью роста: на 20–25-е сутки культивирования его масса изменялась незначительно. Такой каллус отнесен к неморфогенному (рис. 1А). В ряде случаев наблюдали отсутствие стадии дедифференциации и постепенную дегенерацию эксплантов.

Культивирование зародышей, инокулированных на питательную среду, не содержащую осмотический стресс, приводило к формированию на 5–7-е сутки каллусов компактной консистенции, матового желтоватого цвета, узловой формы. Каллус отличался относительно быстрым ростом и на 20–25-е сутки имел большую массу (рис. 1Б).

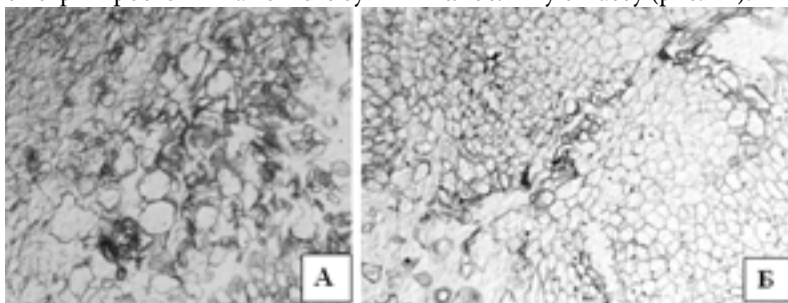


Рис. 1. Неморфогенный (А) и морфогенный (Б) каллусы, полученные при культивировании *in vitro* зрелых зародышей твердой пшеницы

Цито-гистологический анализ продемонстрировал, что клетки такого каллуса в целом меристематичны. По морфологическим при-

знакам их можно объединить в отдельные группы, характерные для формирования морфогенетического очага. В ходе последующих экспериментов было установлено, что именно в таких каллусах отмечаются процессы морфогенеза, поэтому такие структуры обозначены нами как морфогенные.

Сравнительный анализ интенсивности формирования морфогенетических очагов в каллусах, полученных при наличии либо отсутствии осмотического стресса в питательной среде, показал, что появление первых очагов происходит на 5-е сутки культивирования *in vitro*, в количестве трех, на среде, не содержащей хлорид натрия (табл.).

Влияние осмотического стресса
на формирование морфогенетических очагов
в каллусах твердой пшеницы при различной продолжительности
культивирования *in vitro* на иницирующей питательной среде, шт.

Продолжительность культивирования каллусов на питатель- ной среде, сут.	Наличие стресс-фактора в питательной среде	Отсутствие стресс-фактора в питательной среде
	Количество морфогенетических очагов, шт.	
5	0	3
10	0	4
15	1	6
20	2	8
25	2	8
30	3	8

На 10-е сутки культивирования количество морфогенетических очагов увеличивалось до 4, на 15-е сутки – до 6. На 20-е сутки отмечено максимальное в условиях выполненных экспериментов количество морфогенетических очагов, равное 8 (рис. 2). Такой режим культивирования можно считать оптимальным. В ходе дальнейшего культивирования *in vitro* количество очагов не возрастало.

Добавление в питательную среду хлорида натрия в концентрации 1,3% приводило к снижению количества морфогенетических

очагов. Их первые признаки были отмечены лишь на 15-е сутки культивирования каллусов на индукционной среде. Максимальное число выявленных очагов не превысило количества трех. На данном типе сред в дальнейшем формировалось чрезвычайно мало растений-регенерантов.

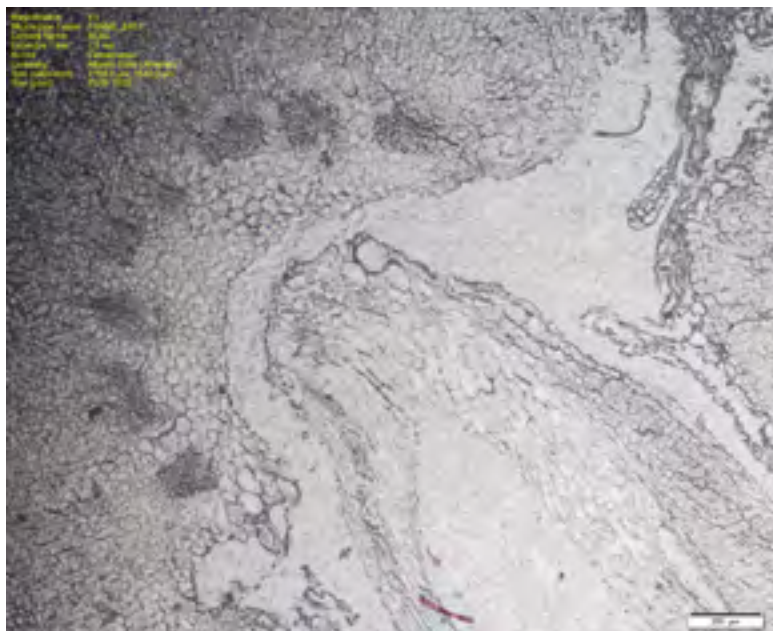


Рис. 2. Морфогенетические очаги в каллусе твердой пшеницы (20 суток культивирования), сформированном на среде в отсутствие осмотического стресса

Заключение. Таким образом, присутствие в питательной среде осмотического стресса, вызванного добавлением 1,3% NaCl, приводило к замедленному росту и существенному снижению регенерационного процесса в формирующихся каллусах твердой пшеницы. Цито-гистологический анализ позволил выявить причины подобных тенденций, заключающиеся в снижении интенсивности клеточной дифференциации, что тормозило формирование морфогенетических очагов.

Библиографический список

Ерещенко О.В., Хлебова Л.П., Розова М.А. Оценка регенерационного потенциала яровой твердой пшеницы для создания засухоустойчивого селекционного материала // Биотехнология и общество в XXI веке : материалы Международной научно-практической конференции. Барнаул, 2015. С. 341–345.

Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфо-генетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. Уфа, 2002. 39 с.

Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Ерещенко О.В. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам // Известия Алтайского государственного университета. 2014. Т. 2, № 3. С. 50–54. DOI: 10.14258/izvasu(2014)3.2-09.

Pellegrineschi A., Brito R.M., McLean S., Hoisington D. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat // Plant Cell, Tissue, Organ Culture. 2004. N 77(3). P. 245–250.

УДК 633.11: 581.143.6

Л.П. Хлебова¹, Е.Д. Никитина²

¹Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

²Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий (Барнаул, Россия)

Морфогенетические процессы в длительно культивируемых каллусах яровой мягкой пшеницы

Проведена оценка влияния ионов серебра в составе питательной среды на каллусогенез, морфогенез и регенерацию *in vitro* трех сортов яровой мягкой пшеницы. Показано, что наиболее благоприятно

ятной для формирования морфогенных каллусов является концентрация нитрата серебра 10 мг/л в сочетании с 120 мг/л аспарагина, что не препятствовало каллусогенным процессам, способствовало сохранению морфогенных потенциалов клеточных культур на протяжении 4-х пассажей, а также супрессировало ризогенез и прямое прорастание зародышей.

Ключевые слова: пшеница, эксплант, незрелый зародыш, длительно культивируемый каллус, морфогенез, регенерация, нитрат серебра.

Одним из подходов к созданию стрессоустойчивого материала сельскохозяйственных культур является отбор клеточных линий *in vitro* на селективных средах, содержащих стресс-фактор. В настоящее время как в нашей стране, так и за рубежом получены растения, устойчивые к фитопатогенам, гербицидам, солевому и водному стрессам, низким и высоким температурам, токсичным дозам алюминия, тяжелым металлам и др. (Джангалина, 2002; Аль-Холани и др., 2010; Мохаммед и др., 2010; Гладков и др., 2013, 2014; Никитина и др., 2013, 2014).

Клеточная селекция, как правило, требует продолжительного культивирования тканей в течение нескольких пассажей. Вместе с тем известно, что в условиях *in vitro* регенерационный потенциал клеток со временем ослабевает. Кроме того, инкубация каллусов в селективных условиях также приводит к снижению частоты морфогенеза. Так, например, для осуществления схемы селекции на устойчивость к NaCl требуется до 7–10 месяцев инкубации каллусных тканей (Бутенко, 1990). Как показали наши исследования, по истечении 8–9 недель нахождения культур на селективных средах на всех вариантах прекращается дальнейшее увеличение клеточной массы либо наблюдается пролиферация неморфогенных аморфных зон, а у части каллусов начинается интенсивный ризогенез (Никитина и др., 2014).

Таким образом, основные требования, предъявляемые к длительно культивируемым тканям, связаны, во-первых, с необходимостью сохранения морфогенных способностей, независимо от времени нахождения в условиях *in vitro*, во-вторых, с отсутстви-

ем меристематизации каллусов на иницирующей среде. Поскольку способность каллусных культур к регенерации растений обусловлена присутствием компетентных к морфогенезу клеток, то их сохранение и преимущественное размножение, а также подбор условий для их пролиферации может способствовать более длительному сохранению морфогенного потенциала каллусными культурами, что существенно облегчит работы по клеточной селекции.

Показано, что добавление нитрата серебра (AgNO_3) и / или аминокислот в питательные среды может существенно улучшить условия для индукции каллуса, органогенеза и соматического эмбриогенеза как у двудольных, так и однодольных растений (Kumar et al., 2009), таких как пшеница (Fernandez et al. 1999; Wu et al., 2006, Bouiamrine et al., 2012), ячмень (Hussein et al., 2004; Haque et al., 2015), кукуруза (Songstad et al., 1991; El-Itriby et al., 2003), сорго (Pola et al., 2009), жемчужное просо (Oldach et al., 2001), кофе (Giridhar et al. 2004) и др. Точный механизм действия AgNO_3 на растения не выяснен. Однако установлено, что ионы серебра являются мощным ингибитором этилена, который, в свою очередь, снижает компетентность культур к соматическому эмбриогенезу *in vitro* у многих видов растений (Kong et al., 2011). Поскольку влияние этилена на способность к эмбриогенезу является генотип-специфичным (Al-Khayri, Al-Bahrany, 2004), сохраняется необходимость проведения исследований в данном направлении.

Цель настоящей работы – изучить влияние нитрата серебра в сочетании с аспарагином на каллусогенез и морфогенную способность каллусов яровой мягкой пшеницы при длительном культивировании *in vitro*.

Исходным материалом служили 15–17-дневные незрелые зародыши трех сортов яровой мягкой пшеницы Чайниз Спринг, Барнаульская 83 и Алтайская 81. Экспланты, выделенные асептически, помещали щитком вверх на питательную среду по прописи Линсмайер-Скуга с полным набором макро- и микросолей, содержащую 0,7% агара, 3% сахарозы и 2,0 мг/л 2,4-Д. Для индукции морфогенеза каллусы пассировали на дифференцирующую среду того же состава минеральных веществ и витаминов, дополненную 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Клеточные культуры выращивали в темноте при

температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ и относительной влажности 60–70%. Каждые 20 дней сформировавшиеся каллусы переносили на свежую питательную среду. Всего выполнено 4 последовательных пассажей. После каждого пассажа часть каллусов переносили на дифференцирующую среду и культивировали на свету при 16-часовом фотопериоде (день) и температуре $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

Влияние ионов серебра на каллусогенез и регенерацию изучали при добавлении в питательную среду AgNO_3 в концентрации от 1 до 14 мг/л (с шагом 2 мг/л) в сочетании с 120 мг/л аспарагина. Контролем служили варианты без добавления нитрата серебра и аминокислоты. Эксперимент выполнен в 6-ти повторениях, по 60 эксплантов на вариант. Оценивали частоты прямого прорастания зародышей, интенсивность каллусогенеза, морфогенеза и регенерации растений (%).

Нами установлено, что увеличение в питательной среде концентрации AgNO_3 до 14 мг/л не оказывало существенного влияния на частоту индукции каллуса у всех изученных генотипов мягкой пшеницы. Уровень признака составил от 84 до 92%. Вместе с тем происходило снижение на 31% частоты прямого прорастания эксплантов. На протяжении 4-х пассажей нитрат серебра значительно повышал частоту морфогенных каллусов, достигая максимального эффекта при концентрации 10 мг/л. Уровень морфогенеза в среднем вырос в 4 раза относительно контрольного значения. При этом происходило снижение частоты ризогенеза в пользу гемморизогенеза, что в итоге приводило к повышению выхода полноценных растений-регенерантов. Стимулирующий эффект ионов серебра на индуцирование гемморизогенных и эмбриогенных каллусов начал снижаться, когда концентрация AgNO_3 превысила 10 мг/л.

Дисперсионный анализ выявил достоверность влияния генотипа на интенсивность гемморизогенных и эмбриогенных процессов независимо от возраста каллуса (числа пассажей). Максимальный эффект оказывал фактор «концентрация нитрата серебра». Кроме того, выявлено достоверно значимое взаимодействие между концентрациями в питательной среде AgNO_3 и генотипами, влияющее на уровень регенерации.

Таким образом, наиболее благоприятной для формирования морфогенных каллусов яровой мягкой пшеницы оказалась концен-

трация нитрата серебра 10 мг/л в сочетании с 20 мг/л аспарагина, что не препятствовало каллусогенным процессам, способствовало сохранению морфогенных потенций клеточных культур на протяжении 4-х пассажей, а также супрессировало ризогенез и прямое прорастание зародышей.

Библиографический список

Аль-Холани Х.Ф.М., Тоайма В.И.М., Долгих Ю.И. Получение растений кукурузы с повышенной устойчивостью к засухе путем клеточной селекции на среде с маннитом // Биотехнология. 2010. № 1. С. 60–67.

Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в сельскохозяйственной науке и практике // Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М., 1990. 195 с.

Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Гладкова О.В. Использование клеточной селекции для получения толерантных к тяжелым металлам газонных трав // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15, № 3 (4). С. 1258–1261.

Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Гладкова О.В. Получение многолетних трав, устойчивых к хлоридному засолению, с помощью клеточной селекции // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 4. С. 106–111.

Джангалина Э.Д. Биотехнология получения эмбриогенных солеустойчивых клеточных линий люцерны : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Алматы, 2002. 26 с.

Мохаммед С.Е., Каранова С.Л., Долгих Ю.И. Получение толерантных к ионам кадмия клеточных линий и растений пшеницы методом клеточной селекции // Современные аспекты структурно-функциональной биологии растений и грибов : материалы Всерос. конф. Орел, 2010. С. 155–159.

Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Ерещенко О.В. Разработка отдельных элементов технологии клеточной селекции яровой пшеницы на устойчивость к абиотическим стрессам // Известия Алтайского гос. ун-та. 2014. Т. 2, № 3. С. 50–54.

Никитина Е.Д., Хлебова Л.П., Соколова Г.Г. Создание источников устойчивости яровой пшеницы к воздействию никеля методами клеточной селекции *in vitro* // Известия Алтайского гос. ун-та. 2013. №3/1(79). С. 88–90.

- Al-Khayri J.M., Al-Bahrany A.M. Genotype-dependent *in vitro* response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to silver nitrate // Sci Hort. 2004. Vol. 99. P. 153–162.
- Bouiamrine E.H., Diouri M., El-Halimi R. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity from mature and immature durum wheat embryos // Int. J. Bio Sci. 2012. Vol. 9(2). P. 29–39.
- El-Itriby H.A., Assem S.K., Hussein E.H.A., Abdel-Calil F.M., Madkour M.A. Regeneration and transformation of egyptian maize inbred lines via immature embryo culture and a biolistic particle delivery system // In Vitro Cellular and Develop Biology – Plant. 2003. Vol. 39(5). P. 524–531.
- Fernandez S., Michaux-Ferrière N., Coumans M. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum*): histology and improvement by AgNO_3 // Plant Growth Regulation. 1999. Vol. 28. No. 3. P. 147–155.
- Giridhar P., Indu E.P., Vinod K. Chandrashekar A., Ravishankar G.A. Direct somatic embryogenesis from *Coffea Arabica* L and *Coffea canephora* P ex Fr. under the influence of ethylene action inhibitor-silver nitrate // Acta Physiologiae Plantarum. 2004. Vol. 26, No. 3. P. 299–305.
- Haque M., Siddique A.B., Islam S.M.S. Effect of silver nitrate and amino acids on high frequency plants regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant Tissue Cult. & Biotech. 2015. Vol. 25(1). P. 37–50.
- Hussein E.H.A., Madkour M.A., Assem S.K., Radwan A.M.A. Embryogenic callus formation and plant regeneration from immature embryos of some barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) // Arab J. Biotech. 2004. Vol. 7(1). P. 111–122.
- Kong D., Shen H., Li N. Influence of AgNO_3 on somatic embryo induction and development in Manchurian ash (*Fraxinus mandshurica* Rupr.) // African Journal of Biotechnology. 2012. Vol. 11(1). P. 120–125.
- Kumar V., Parvatam G., Ravishankar G.A. AgNO_3 – a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. Electronic J. Biotechnol. 2009. Vol. 12(2)/ P. 1–15.
- Oldach K., Morgenstern A., Rother S., Girgi M., O’Kennedy M., Lörz H. Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L) R Br] and *Sorgum bicolor* (L) Moench. // Plant Cell Rep. 2001. Vol. 20(5). P. 416–421.
- Pola S., Mani N.S., Ramana T. Long-term maintenance of callus cultures

from immature embryo of *Sorghum bicolor* // World J. Agri. Sci. 2009. Vol. 5(4). P. 415–421.

Songstad D.D., Armstrong C.L., Petersen W.L. Silver nitrate increase type II callus production from immature embryos of maize inbred B73 and its derivatives // Plant Cell Reports. 1991. Vol. 9. No. 12. P. 699–702.

Wu L.M., Wei Y.M. Zheng Y.L. Effects of silver nitrate on the tissue culture of immature wheat embryos // Russian Journal of Plant Physiology. 2006. Vol. 53. P. 530–534.

ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 57.02:641/642(045)

Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьников

*Бийский технологический институт (филиал) Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова
(Бийск, Россия)*

Синергизм экзогенных антиоксидантов в пищевых продуктах

Рассмотрены вопросы, касающиеся некоторых аспектов физиологической роли растительных экзогенных антиоксидантов, показано их место и определено значение в антиоксидантной системе защиты организма человека от проявлений окислительного стресса. Механизм действия пищевых антиоксидантов в реакциях свободнорадикального окисления основан на способности этих соединений блокировать перекисные радикалы и другие активные метаболиты кислорода, замедляя или полностью останавливая реакцию автоокисления на клеточном уровне. Проведенные аналитические исследования показывают наличие большого количества различных по своей природе антиоксидантов, относящихся к разным классам органических соединений – токоферолы, каротиноиды, фенольные вещества и др. Наиболее многочисленную группу натуральных антиокислителей составляют фенольные вещества – флавонолы, антоцианы, дубильные вещества, катехины и другие соединения, в составе которых присутствует ароматическое кольцо и одна или несколько гидроксильных групп. В различных частях растений они содержатся в форме как гликозидов, так и агликонов, причем активность гликозидов несколько выше, чем агликонов, особенно выражено это проявляется для катехинов. Отмечено, что на ингибирование окислительных процессов большое влияние оказывает синергизм, проявляющийся в усилении эффективности антиоксидантов в присутствии других веществ. Явление синергизма в отношении фенольных соединений рассмотрено на примере многокомпонентных напитков – безалкогольных бальзамов. Показано влияние аскорбиновой кислоты и каротиноидов на усиление антиоксидантного эффекта фенольных соединений растительного сырья, входящего

в состав купажей бальзамов. Антиоксидантная активность растворов индивидуальных веществ, двухкомпонентных смесей и бальзамов измерена вольтамперометрическим методом. В результате работы отмечено, что универсального экзогенного антиоксиданта не существует, а эффективность его применения зависит как от свойств и строения самого антиоксиданта, так и от химического состава ингредиентов, входящих в рецептуру пищевого продукта или напитка. Применение индивидуальных антиоксидантов не позволяет полностью предотвратить автоокисление и образование свободных радикалов, в связи с чем возникает необходимость использования несколько антиоксидантов, взаимно усиливающих или дополняющих действие друг друга.

Ключевые слова: пищевые антиоксиданты, синергизм, антиоксидантная активность, высокоактивные формы кислорода, пищевые ингредиенты, безалкогольные бальзамы.

Введение. В организме человека регулярно происходят окислительно-восстановительные процессы. Многие биохимические реакции, обеспечивающие жизнедеятельность клеток, идут с образованием и участием свободных радикалов, избыточное образование которых и, как следствие, возникновение окислительного стресса происходит под влиянием таких факторов, как систематический прием некоторых лекарственных препаратов, загрязнение окружающей среды, некачественное и неправильное питание, в том числе систематическое переедание, УФ-облучение, курение, эмоциональные стрессы, злоупотребление алкоголем и др.

К активным формам кислорода относят большое количество образующихся в организме промежуточных метаболитов кислорода, которые, являясь чрезвычайно реакционноспособными соединениями, способны включаться в биохимические процессы на клеточном уровне и повреждать практически все структурные компоненты биологической системы. Основные пути образования активных форм кислорода наглядно представлены в работе (Shahmardanova, 2016).

Повышенные уровни активных форм кислорода инициируют реакции свободнорадикального окисления, в процессе которых радикалы кислорода взаимодействуют с различными субстратами,

образуя перекиси, а также радикалы кетонов и альдегидов, индуцирующих реакцию автоокисления. Под действием свободных радикалов происходит изменение функциональных свойств ряда ферментов, углеводов, белков, нуклеиновых кислот, вследствие чего клетка утрачивает присущие ей биологические функции с образованием аномальных метаболитов и стимуляцией вторичных деструктивных процессов (Shahmardanova, 2016).

С негативным воздействием свободных радикалов борется собственная антиоксидантная система человека (АОС), блокирующая образование высокоактивных радикалов, главным компонентом которой является сеть ферментов: супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза, параоксоназа и др. (Колесникова, 2013), а также ряд метаболитов клетки: α -липоевая и мочеваая кислоты, карнозин, эстроген, билирубин и др. Кроме того, в составе АОС можно выделить и другие антиоксиданты: эндогенные – неферментные металлсвязывающие белки и экзогенные, так называемые пищевые антиоксиданты, представляющие собой обширную группу веществ различной природы и механизма физиологического воздействия.

К пищевым антиоксидантам (АО) относят прежде всего не синтезируемые в организме человека низкомолекулярные биорегуляторы: витамин С (аскорбиновая кислота), витамин Е (токоферолы и токотриенолы), витамин К (нафтохиноны), витамин А (каротин и каротиноиды), коэнзим Q₁₀, фенольные соединения – флавоноиды (рутин, кверцетин, цитрин, гесперидин и др.), дубильные вещества, фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты, серосодержащие пептиды (глутатион) и аминокислоты (цистеин, метионин), а также ряд микроэлементов (медь, железо, селен, цинк и марганец).

Ввиду многообразия экзогенных антиоксидантов, поступающих в организм человека с пищей, напитками, БАД к пище и лекарственными препаратами, предприняты попытки их систематизации. Так, в качестве классификационных признаков рассматриваются:

- 1) природа АО: природные и синтетические аналоги природных (Шаталов, 2015);
- 2) растворимость АО: водорастворимые (рибофлавин, глутатион, мочеваая и аскорбиновая кислоты, растворимые соли α -липоевой кислоты и др.) и жирорастворимые (филлохинон и убихинон, то-

- коферолы и токотриенолы, каротиноиды, стероидные гормоны, α -липоевая кислота и др.). Следует отметить, что к водорастворимым АО часто относят некоторые микроэлементы, которые не имеют самостоятельного антиоксидантного действия, однако являются коферментами некоторых антиоксидантных ферментов, обеспечивая их функционирование (Канаровский, 2017);
- 3) тип действия АО: прямое – непосредственное гашение свободных радикалов (витамин Е (токоферолы и токотриенолы), витамин А, витамин С и др.) и непрямое – активация АОС организма (витамины группы В, ионы железа, меди и марганца, селен, каротины и каротиноиды, метионин, цистеин, а также глутаминовая и α -липоевая кислоты);
- 4) вид и механизм воздействия АО: индивидуальные вещества и смеси АО, способные проявлять синергетический эффект (Шаталов, 2015; Канаровский, 2017).

Многочисленными исследованиями доказано, что интенсивность окислительного стресса можно корректировать при употреблении различных природных пищевых антиоксидантов (Наумова, 2014; Молибога, 2013; Яшин, 2014). Однако на сегодняшний день остаются не до конца изученными вопросы, касающиеся, во-первых, биодоступности АО при употреблении пищевых продуктов и напитков; во-вторых, метаболизма АО в органах и тканях человека, так как некоторые метаболиты обладают определенной антиоксидантной активностью; в-третьих, ферментативной кинетики антиоксидантов и их метаболитов; в-четвертых, взаимному усилению действия АО, так как отдельные АО способны проявлять синергизм по отношению друг к другу и т.д.

В связи с этим и исходя из физико-химических характеристик и типа взаимного влияния АО особый интерес представляет применение смеси пищевых АО. Что хорошо согласуется с одним из современных трендов при разработке рецептур пищевых продуктов – конструирование состава и прогнозирование влияния на организм полифункциональных систем, характеризующихся наличием соединений с разной биологической активностью. Целью данного исследования является изучение влияния экзогенных АО на высокоактивные формы и соединения кислорода для прогнозирования ак-

тивности комбинированных пищевых ингредиентов антиоксидантной направленности с позиции нутрициологии.

Материалы и методы исследований. Материалами исследования явились современные экспериментальные данные по составу, свойствам, механизму воздействия и взаимодействия экзогенных АО. В работе использованы экспертно-аналитические методы научных исследований: поиск, обработка научных и экспериментальных данных, их систематизация, анализ и моделирование; метод катодной вольтамперометрии по Короткову (Короткова, 2004).

Результаты и их обсуждение. Антиоксидантная активность (АОА) продуктов питания из растительного сырья обусловлена наличием сложного комплекса биологически активных веществ (БАВ), среди которых ведущая роль принадлежит фенольным соединениям (биофлавоноидам, фенолкарбоновым кислотам, дубильным веществам и др.), некоторым органическим кислотам, ряду витаминов и др. (Чугунова, 2010). Ранее показано, что многие из перечисленных веществ либо являются синергистами, либо проявляют аддитивный эффект в отношении друг друга (Зайнуллин, 2011а, 2011б).

Так как эффективность действия того или иного АО зависит в основном от его концентрации и реакционной способности по отношению к конкретным видам активных форм кислорода, то для достоверного прогнозирования воздействия природных пищевых АО на органы и системы человека рассмотрена их биологическая активность. В общем виде эта зависимость представлена в таблице 1 (Белый, 2012; Тарховский, 2013).

Согласно представленным в таблице 1 данным, наиболее высокой АОА обладают флавоноиды, содержащиеся в большинстве видов лекарственно-технического сырья. Антиоксидантные свойства флавоноидов основаны на способности взаимодействовать со свободными радикалами, связывая их в неактивные соединения, а также хелатировать ионы металлов, катализирующих реакции перекисного окисления, даже в очень малых количествах (Тарховский, 2013). Реакционная способность флавоноидов в окислительно-восстановительных процессах достаточно высока и зависит от количества и положения гидроксильных групп и структуры молекулы (см. табл. 2) (Тарховский, 2013).

Таблица 1

Влияние пищевых антиоксидантов
на высокоактивные формы и соединения кислорода

Антиоксидант	Гидрок- силь- ный ради- кал	Супер- оксид	Син- глет- ный кисло- род	Пере- кись водо- рода	Пере- киси липи- дов	Ради- кал ДФПГ*
Аскорбиновая кислота (вита- мин С)	+	+	-	+	-	+
β -каротин (провитамин А)	-	-	+	+	+	+
α -токоферол (витамин Е)	-	-	-	+	+	+
Убихинон (ко- фермент Q ₁₀)	-	-	-	+	+	+
α -липоевая кислота	+	-	+	+	-	-
Флавоноиды	+	+	-	+	+	+
Дубильные вещества	+	+	-	+	+	+

* – дифенилпикрилгидразил

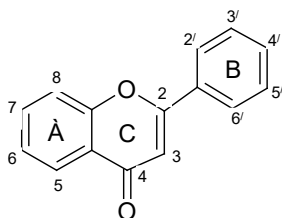
Согласно данным таблицы 2, наблюдается прямая зависимость между количеством гидроксильных групп в молекуле флавоноида и его антиоксидантной активностью: антиоксидантная активность увеличивается с увеличением количества фенольных ОН-групп в молекуле. Высокой активностью обладают флавонолы кверцетин ($6,6 \pm 0,5$) и мирицетин ($7,1 \pm 0,5$), однако наиболее активны флаван-3-олы. Причем антиоксидантная активность О-гликозидов в $1,34 \pm 0,03$ раза выше их агликонов. Максимальной антиоксидантной активностью обладает галлат эпигаллокатехина ($9,3 \pm 1,4$).

Механизм антиоксидантного действия флавоноидов основан на замедлении либо полном прекращении процессов автоокисления как на стадии иницирования цепи путем связывания актив-

ных форм кислорода, так и на стадии роста цепи, являясь донором электрона (или атома водорода) с образованием феноксилов (радикалы ароматических спиртов). Образующиеся феноксила активно вступают в реакции с радикалами, обрывая цепь. Возможно и восстановление окисленных форм фенолов, особенно в присутствии веществ-синергистов. Классическим примером синергиста флавоноидов является аскорбиновая кислота, которая при совместном присутствии в продукте усиливает их ингибирующее действие, но сама по себе не тормозит процесс свободнорадикального окисления.

Таблица 2

Соотношение структуры и активности флавоноидов
в присутствии радикала дифенилпикрилгидразина



Наименование флавоноидов	Положение гидроксильной группы						Соотношение флавоноид:радикал, моль/моль
	3	5	7	3'	4'	5'	
Флавоны							
Апигенин	-	ОН	ОН	-	ОН	-	0
Лютеолин	-	ОН	ОН	ОН	ОН	-	3,9±0,4
Флавонолы							
Кемпферол	ОН	ОН	ОН	-	ОН	-	1,9±0,1
Фисетин	ОН	-	ОН	ОН	ОН	-	6,1±0,8
Кверцетин	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	-	6,6±0,5
Мирицетин	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	7,1±0,5
Флаван-3-олы							
Эпикатехин	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	-	4,9±0,4

Эпикатехин галлат	О-галлат	ОН	ОН	ОН	ОН	-	6,4±0,7
Эпигаллокатехин	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	6,8±0,6
Эпигаллокатехин галлат	О-галлат	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	9,3±1,4

Основными источниками поступления флавоноидов в организм человека служат фрукты, овощи и безалкогольные напитки, в том числе многокомпонентные, например, – бальзамы, где синергизм экзогенных АО проявляется особенно явно.

Вольтамперометрическим методом нами измерена антиоксидантная активность трех образцов безалкогольных бальзамов, составившая от 5,20±0,03 до 6,20±0,10 мкмоль/л в мин (Школьников, 2012). Полученные данные сопоставимы с АОА других безалкогольных напитков (Короткова, 2003).

В купажи исследуемых бальзамов входят спиртованные морсы и настои плодов шиповника обыкновенного (*Rosa canina* L.), рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia*) и черноплодной (*Aronia melanocarpa*), боярышника обыкновенного (*Crataegus laevigata*), черемухи обыкновенной (*Prunus padus*) и др., которые, наряду с веществами фенольной природы, отличаются высоким содержанием витамина С. Это лекарственно-техническое сырье, входящее в состав многих бальзамов, образует усиливающие действие друг друга парные компоненты: плоды шиповника – трава зверобоя, плоды шиповника – плоды рябины, плоды рябины – трава душицы и др. Механизм синергетического эффекта аскорбиновой кислоты в отношении фенольных соединений определяется в способности биофлавоноидов, во-первых, образовывать прочные хелатные комплексы с ионами металлов, катализирующих окисление аскорбиновой кислоты, предотвращая каталитическую реакцию, во-вторых, снижать окислительно-восстановительный потенциал самой аскорбиновой кислоты (Базарнова, 2007).

Ещё более мощный синергетический эффект отмечен при комбинировании сырья, содержащего каротиноиды, аскорбиновую кислоту и полифенолы. Вероятно, это обусловлено одновременным

присутствием в системе и водорастворимых, и жирорастворимых антиоксидантов, что обеспечивает антиоксидантный эффект в водной среде внеклеточного пространства и цитозоле клетки (аскорбиновая кислота + фенольные соединения), а также в липидном слое мембраны клеток (каротиноиды + фенольные соединения). Традиционно источниками каротина, аскорбиновой кислоты и биофлавоноидов в купажной смеси бальзамов являются плоды рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia*), в экстракте которых обнаружены α - и β -каротины (18-20 мг% β -каротина, в пересчете на а.с.в.), криптоксантин, аурохром, мутахром, фитофлуин, лютеин, зеаксантин, виолоксантин и др., плоды шиповника обыкновенного (*Rosa canina* L.), содержащего каротин, виолоксантин, рубиксантин, ликопин, арумин, ксантофилл и др., почки сосны (*Pinus*), листья мяты перечной (*Mentha piperita*) (содержание β -каротина до 40 мг%), листья мать-и-мачехи (*Tussilago farfara*), трава донника лекарственного (*Melilotus officinalis*) и др.) (Школьников, 2012).

Заслуживает внимания и аддитивное действие ряда антиоксидантов, заключающееся в дополнении антиоксидантной способности одного или нескольких активных веществ растительного сырья. Экспериментальные исследования показали, что хорошо дополняют друг друга экстракты растений, входящие в состав композиций бальзамов, содержащие производные оксикоричных кислот – плоды рябины и боярышника. Аддитивное действие также проявляют различные подклассы флавоноидов, особенно хорошо суммируется действие гликозидов растений, относящихся к семейству розоцветные (*Rosaceae*) – шиповник обыкновенный (*Rosa canina* L.), рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia*), боярышник обыкновенный (*Crataegus laevigata*) и малина обыкновенная (*Rubus idaeus*) и семейству бобовые (*Fabaceae*) – донник лекарственный (*Melilotus officinalis*).

Также в составе исследуемых образцов безалкогольных бальзамов обнаружено растительное сырье, отличающееся высоким содержанием дубильных веществ. Это прежде всего бадан толстолистный (*Bergenia crassifolia* L.), содержание дубильных веществ в котором достигает 25,1% (в пересчете на а.с.в.), представленных в основном галлотанинами (гликозиды галловой кислоты), являющимися наиболее важными представителями гидролизуемых дубильных веществ; кор-

невища с корнями родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), дубильные вещества которой относятся к группе пирогалловой кислоты – 15–20 %; трава тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), в составе которой наряду с дубильными веществами (2,8–3,8 %) присутствует и аскорбиновая кислота, являющаяся синергистом дубильных веществ; корневища и корни девясила высокого (*Inula helenium* L.), суммарное содержание дубильных веществ в котором составляет порядка 8,3 % (Школьников, 2012).

Выводы. Основываясь на полученных экспериментальных данных по зависимости антиоксидантной активности безалкогольных бальзамов от химического состава лекарственно-технического сырья, входящего в купажи, можно предположить, что эти многокомпонентные напитки могут служить источником пищевых антиоксидантов, среди которых особое значение имеют фенольные вещества, каротиноиды и витамин С, эффект синергизма которых проявляется наиболее выражено при совместном действии. Однако механизм взаимного влияния экзогенных антиоксидантов при их совместном присутствии в пищевых продуктах и напитках нуждается в дальнейшем систематическом детальном исследовании.

Библиографический список

- Базарнова Ю.Г. Исследование содержания некоторых биологически активных веществ, обладающих антиоксидантной активностью, в дикорастущих плодах и травах // Вопросы питания. 2007. № 1. С. 22–26.
- Белый А.В., Белая Н.И. Антирадикальная активность дубильных веществ корневищ *Bergenia crassifolia* в реакции с 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразилом // Химия растительного сырья. 2012. № 3. С. 121–126.
- Зайнуллин Р.А., Макарова Н.В., Яшин А.Я., Школьников М.Н. Антиоксидантные свойства алкогольных бальзамов. Ч. 1 // Ликероводочное производство и виноделие. 2011а. №7(139). С. 6–9.
- Зайнуллин Р.А., Макарова Н.В., Яшин А.Я., Школьников М.Н. Антиоксидантные свойства алкогольных бальзамов. Ч. 2 // Ликероводочное производство и виноделие. 2011б. №8(140). С. 16–18.
- Канаровский Е.Ю., Ялтыченко О.В., Горинчой Н.Н. Кинетика антиоксидантной активности α -токоферола и некоторых его гомологов. Ч. 1: Обзор проблемы. Теоретическая модель // Электронная обра-

ботка материалов. 2017. № 5(53). С. 48–66.

Колесникова Л.И., Баирова Т.А., Первушина О.А. Этногенетические маркеры антиоксидантной системы (обзор литературы) // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2013. № 4(92). С. 166–171.

Короткова Е.И., Аврамчик О.А., Юсубов М.С., Белоусова М.В. Определение антиоксидантной активности экстрактов растительного сырья методом катодной вольтамперометрии // Химико-фармацевтический журнал. 2003. № 9 (37). С. 55–56.

Короткова Е.И., Карбаинов Ю.А. Патент 2224997 РФ, С 1 G 01 N 33/00. Вольтамперометрический способ определения суммарной активности антиоксидантов, № 2002115232/12; Заявлено 06.06.2002; Опубликовано 27.02.2004.

Молибога Е.А., Савельева Ю.С. Роль антиоксидантов в жизни человека, их содержание в продуктах питания // Вестник Омского гос. аграрного университета. 2013. №3(11). С. 48–50.

Наумова Н.Л. Современный взгляд на проблему исследования антиоксидантной активности пищевых продуктов // Вестник ЮУрГУ. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2014. № 2(1). С. 5–8.

Тарховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино, 2013. С. 52–63.

Чугунова О.В., Пастушкова Е.В. Антиоксидантная активность как показатель профилактической эффективности функциональных продуктов // Известия УрГЭУ. 2010. № 6(32). С. 174–177.

Шаталов Д.О., Кедик С.А., Иванов И.С., Бирюлин С.И. Антиоксиданты, как перспектива снижения заболеваний системы кровообращения, возникающих по причине ухудшающейся экологической обстановки // Вестник МИТХТ. Серия: Социально-гуманитарные науки и экология. 2015. № 3. С. 52–58.

Школьникова М.Н. Методологические аспекты формирования и оценки качества многокомпонентных напитков на основе растительного сырья : дис. ... д-ра техн. наук. Кемерово, 2012. 438 с.

Яшин Я.И., Яшин А.Я., Веденин А.Н. Природные антиоксиданты – неотъемлемая часть здорового и полноценного питания. Проблемы антиоксидантной терапии // Вопросы питания. 2014. № 3(83). С. 39–40.

Shahmardanov S.A., Gulevskaya O.N., Galenko-Yaroshevsky P.A., Kolesnichenko P.D. Development perspectives of new generation

medications based on the redox system regulators // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2016. № 2 (4). С. 95–102. DOI: 10.18413/2500-235X-2016-2-4-95-102.

УДК 664.786

Л.В. Анисимова¹, Солтан Осама Исмаил Ахмед^{1, 2}

¹Алтайский государственный технический университет

им. И.И. Ползунова (Барнаул, Россия)

²Minia University (Эль-Минья, Египет)

Влияние добавки пажитника и брусники на качество овсяной муки при хранении

Изучено влияние добавки пажитника и брусники, содержащих природные антиоксиданты и обладающих антибактериальными и противогрибковыми свойствами, на стойкость при хранении овсяной муки. Овсяную муку вырабатывали из зерна овса, прошедшего гидротермическую обработку с увлажнением под вакуумом, отволаживанием и сушкой. К овсяной муке добавляли измельченные семена пажитника или измельченные сушеные ягоды брусники. Полученные смеси хранили в полиэтиленовых пакетах при температуре $(40 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха $(65 \pm 0,1\%)$. В опытах использовали методику «ускоренного старения», позволяющую моделировать изменение качества продукции при хранении за более короткий срок. Для сравнения на хранение были также направлены образцы овсяной муки без добавок. Качество овсяной муки оценивали по показателям кислотности по болтушке и кислотному числу жира. Кроме того, определяли микробиологические показатели безопасности овсяной муки в процессе хранения. Микробиологический анализ образцов овсяной муки с добавлением и без добавления пажитника и брусники показал, что для всех образцов общее количество мезофильных

аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов как при закладке на хранение, так и в процессе хранения было ниже максимально допустимого предела, указанного в Техническом регламенте Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». Плесневые грибы во всех исследуемых образцах овсяной муки обнаружены не были. По результатам исследования установлено, что добавление пажитника и брусники, содержащих натуральные антиоксиданты, к овсяной муке, полученной с использованием гидротермической обработки зерна, позволяет замедлить развитие окислительных процессов в муке при хранении. Пажитник по сравнению с брусникой оказал несколько большее антиоксидантное воздействие: кислотность по болтушке и кислотное число жира при добавлении к овсяной муке пажитника возрастали медленнее, чем в других образцах. Вместе с тем брусника в наибольшей степени проявила антибактериальные свойства при хранении овсяной муки. Было предположено, что совместное добавление брусники и пажитника к овсяной муке приведет к дополнительному увеличению ее стойкости при хранении. Однако это требует дальнейших исследований, в том числе органолептических свойств нового продукта.

Ключевые слова: овсяная мука, гидротермическая обработка, пажитник, брусника, кислотность, кислотное число жира, микробиологические показатели безопасности.

Введение. Наличие пищи – один из необходимых факторов существования человека. Важным элементом пищи с древних времен являются зерновые продукты. Однако срок хранения продуктов питания, в том числе продуктов переработки зерна, весьма ограничен из-за их подверженности различным видам порчи. Стойкость при хранении продуктов питания определяется особенностями их химического состава, включающего белки, углеводы, жиры, воду и прочие сложные и простые вещества. Так, окисление жиров и образование свободных радикалов – естественные явления в биологических и пищевых системах.

Антиоксиданты стали незаменимой группой пищевых добавок в основном из-за своих уникальных свойств увеличивать срок хра-

нения продуктов питания без ущерба для сенсорного восприятия и питательных свойств. Американское управление по продовольствию и медикаментам (FDA) определяет антиоксиданты как «вещества, используемые для сохранения пищевых продуктов за счет замедления порчи, прогоркания или обесцвечивания из-за окисления» (Nanditha, 2009).

Овес (*Avena sativa* L.) – культура, привлекающая внимание людей за свои свойства, способствующие укреплению здоровья. Эти свойства сделали овес привлекательным для новых пищевых применений. Разработка новых пищевых продуктов с использованием овса приведет к расширению ассортимента продукции на его основе. Однако применение овса ограничено из-за его склонности к прогорканию и формированию горького вкуса и неприятного запаха во время обработки и хранения (Scott, 2015).

Натуральные полифенольные антиоксиданты привлекают внимание ученых, изучающих пищевые продукты, из-за их положительного воздействия на здоровье человека. Одной из перспективных культур, содержащих природные антиоксиданты, является пажитник. Пажитник – хороший источник многих питательных веществ, обладает лекарственными свойствами. Его семена богаты витаминами А, С, фолиевой кислотой, клетчаткой и другими разнообразными минеральными веществами. Добавление волокна пажитника к рафинированной муке помогает сбалансировать соотношение растворимой и нерастворимой клетчатки (Wani, 2015). Семена пажитника используются как пряность для придания вкуса и аромата пищевым продуктам, а также в сравнительно больших количествах их добавляют в супы и блинчики. Пажитник обладает противодиабетическим, гепатопротекторным, гипохолестеринемическим действием, стимулирует пищеварение (Reddy, 2011).

Брусника – еще один природный антиоксидант и антисептик. Эта ягода была включена в рацион человека с незапамятных времен. Брусника широко используется во многих странах. Например, в Скандинавии ее применяют при изготовлении желе, джемов, соков, выпечки и других изделий (Lehtonen, 2013). Брусника имеет более высокий антиоксидантный потенциал, чем другие ягоды, такие как черника, клюква, земляника, малина (Bakowska-

Barczak, 2007). Исследования показали, что брусника обладает высокой антиоксидантной активностью, в первую очередь из-за высокого уровня полифенольных соединений, в том числе антоцианов (Isaak, 2015).

В связи с тем, что в настоящее время большое внимание уделяется здоровым продуктам питания, появилось стремление к разработке и производству продуктов, которые по питательным свойствам превосходят имеющиеся на рынке и не содержат синтетических добавок (Lindley, 1998). С учетом сказанного нами было изучено влияние добавки пажитника и брусники, содержащих природные антиоксиданты, на стойкость при хранении овсяной муки. Полученные в исследованиях результаты используются в разработке рецептур новых продуктов на основе овсяной муки.

Материалы и методы. Овсяную муку вырабатывали из зерна овса, прошедшего гидротермическую обработку (ГТО) с увлажнением под вакуумом, отволаживанием и сушкой. Нешлифованное ядро измельчали с помощью лабораторной мельницы *Perten Laboratory Mill 3100* (Финляндия) с просеиванием через металлотканое сито 0,8 мм.

Семена пажитника (Египет) и сушеные ягоды брусники (Россия) после очистки измельчали на лабораторной мельнице ЛЗМ и просеивали, как и овсяную муку, через металлотканое сито 0,8 мм.

К овсяной муке добавляли 13,5 % измельченных семян пажитника или 13,5% измельченных сушеных ягод брусники. Полученные смеси упаковывали в полиэтиленовые пакеты и закладывали на хранение при температуре $40 \pm 0,5$ °C и относительной влажности воздуха $65 \pm 0,1$ %. В опытах использовали методику «ускоренного старения» (Vybornov, 2014), позволяющую моделировать изменение качества продукции при хранении за более короткий срок. Для сравнения на хранение были также направлены образцы овсяной муки без добавок.

Качество овсяной муки с добавками и без добавок оценивали по показателям кислотности по болтушке (ГОСТ 27493-87) и кислотному числу жира (ГОСТ 31700-2012) при закладке на хранение и через каждые две недели в процессе хранения.

Микробиологический анализ (ГОСТ 10444.15-94) осуществляли при закладке образцов на хранение и через каждый месяц при хранении.

Схема получения овсяной муки и закладки ее на хранение приведена на рисунке 1.

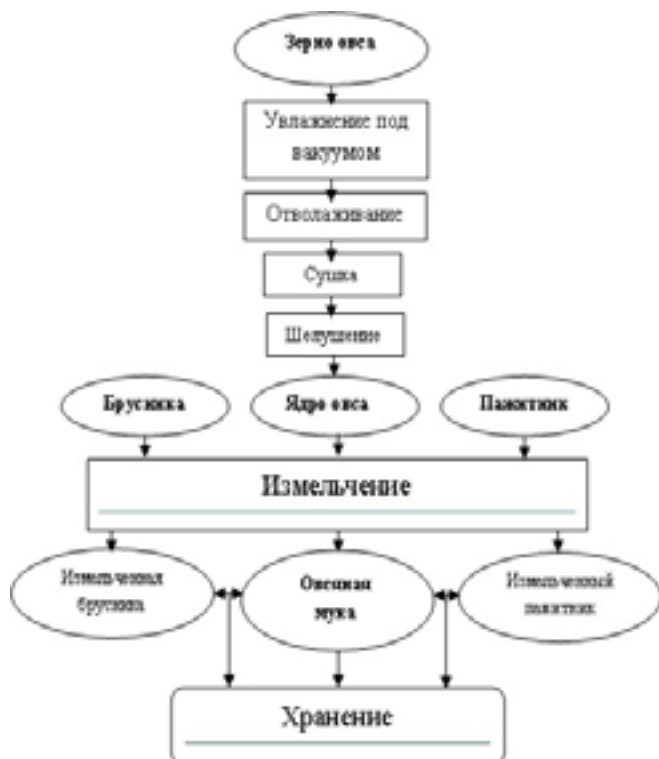


Рис. 1. Схема получения овсяной муки и закладки ее на хранение

Результаты и их обсуждение. На рисунках 2 и 3 показаны результаты исследования кислотности по болтушке и кислотного числа жира овсяной муки без добавок и овсяной муки с пажитником и брусникой в процессе хранения. Оба показателя являются хорошими индикаторами качества овсяной муки.

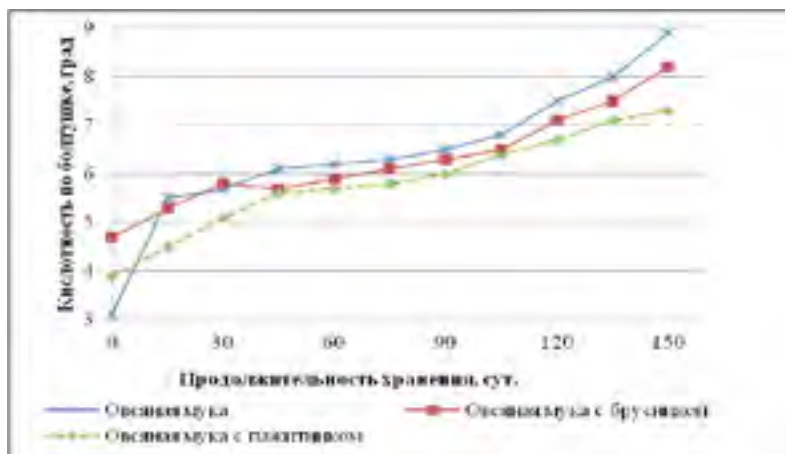


Рис. 2. Влияние продолжительности хранения овсяной муки на кислотность по болтушке

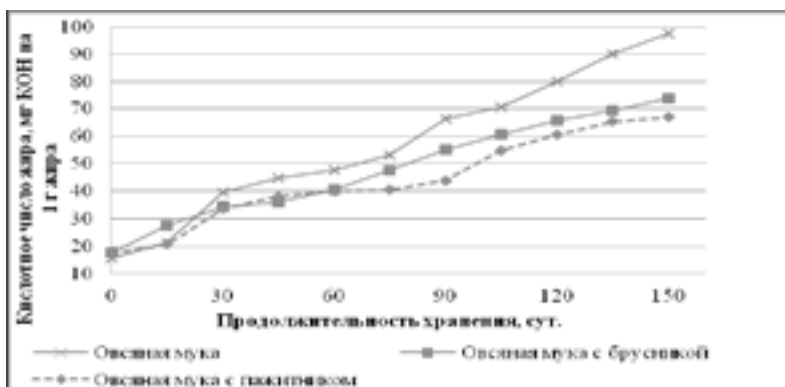


Рис. 3. Влияние продолжительности хранения овсяной муки на кислотное число жира

Анализ приведенных данных показывает, что при закладке на хранение наиболее низкую кислотность по болтушке имела овсяная мука. Однако в процессе хранения кислотность овсяной муки возрастала более быстрыми темпами и уже через 30 дней вышла на уровень этого показателя для овсяной муки с добавкой брусники.

Следует отметить, что кислотность овсяной муки с брусникой изначально была выше кислотности овсяной муки без добавок, что объясняется высоким содержанием кислореагирующих веществ в ягодах брусники. Замедление роста кислотности овсяной муки с брусникой связано с высоким содержанием антиоксидантов в ягодах брусники, снижающих накопление кислореагирующих веществ в овсяной муке при хранении.

Кислотность овсяной муки с пажитником при закладке на хранение была выше кислотности овсяной муки без добавок, но ниже кислотности овсяной муки с брусникой. В процессе хранения этот показатель качества у смеси с пажитником изменялся самыми медленными темпами и на протяжении всех пяти месяцев хранения оставался на самом низком уровне.

Кислотное число жира (КЧЖ) во всех образцах, закладываемых на хранение, было примерно одинаковым. С течением времени наиболее быстро КЧЖ возрастало в овсяной муке без добавок. Это объясняется накоплением в первую очередь непредельных жирных кислот при гидролизе липидов овса, особенностью которых является быстрое их дальнейшее окисление до перекисей, гидроперекисей и других продуктов гидролиза. Добавка к овсяной муке брусники и пажитника привела к замедлению роста КЧЖ обеих исследуемых смесей.

Несколько лучший эффект по снижению уровней кислотности по болтушке и кислотного числа жира дало добавление к овсяной муке пажитника. Возможно, это объясняется высоким содержанием фенольных соединений в семенах пажитника, обладающих сильными антиоксидантными свойствами (Reddy, 2011).

Результаты микробиологического анализа образцов овсяной муки с добавлением и без добавления пажитника и брусники приведены в таблице.

Для всех образцов общее количество бактерий как при закладке на хранение, так и в процессе хранения было ниже максимально допустимого предела, указанного в Техническом регламенте Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». В соответствии с требованиями данного документа количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганиз-

мов (КМАФАнМ) в муке из зерновых культур не должно превышать 5,0·10⁴ КОЕ/г, плесеней – 200 КОЕ/г.

Плесневые грибы во всех исследуемых образцах овсяной муки обнаружены не были. Отсутствие плесневых грибов в овсяной муке без добавок объясняется влиянием гидротермической обработки зерна при подготовке его к шелушению. Под воздействием вакуума и высокой температуры происходит частичная стерилизация зерна. В процессе хранения овсяной муки с добавками противогрибковый эффект дают брусники и пажитник (Sajad, 2018).

Из представленных данных также видно, что в течение первых 30 дней произошло увеличение количества бактерий в образце овсяной муки без добавок. При дальнейшем ее хранении количество бактерий существенно уменьшилось. Это связывают с заметным увеличением кислотности овсяной муки (Berghofer, 2003).

Влияние добавки пажитника и брусники на микробиологические показатели безопасности овсяной муки в процессе хранения

Образец	Наименование показателя	Продолжительность хранения, сут.					
		0	30	60	90	130	160
Овсяная мука	КМА-ФАнМ, КОЕ/г·10 ³	4,0	16,0	5,2	5,2	1,8	1,0
Овсяная мука с брусникой		4,8	2,9	2,8	2,1	2,0	1,2
Овсяная мука с пажитником		14,5	6,0	5,8	5,5	5,0	2,1

При хранении овсяной муки с добавлением брусники количество бактерий в образцах снизилось в наибольшей степени, что можно объяснить антибактериальным и противогрибковым действием некоторых компонентов, например, флавоноидов, входящих в химический состав брусники (Negi, 2012).

Фенольные соединения пажитника (Joglekar, 2012) дают такой же эффект: сравнительно высокое содержание бактерий в свежей овсяной муке с пажитником, что связано с большей бактериальной обсемененностью пажитника, заметно снижается в процессе хранения.

Выводы. Результаты исследования показали, что добавление пажитника и брусники, содержащих натуральные антиоксиданты,

к овсяной муке, полученной с использованием гидротермической обработки зерна, позволяет замедлить развитие окислительных процессов в муке при хранении. Пажитник по сравнению с брусникой оказал несколько большее антиоксидантное воздействие: кислотность по болтушке и кислотное число жира при добавлении к овсяной муке пажитника возрастали медленнее, чем в других образцах. Вместе с тем брусника в наибольшей степени проявила антибактериальные свойства при хранении овсяной муки. Таким образом, можно предположить, что совместное добавление брусники и пажитника к овсяной муке приведет к дополнительному увеличению стойкости овсяной муки при хранении. Однако это требует дальнейших исследований, в том числе органолептических свойств нового продукта.

Библиографический список

- Bakowska-Barczak A.M., Marianchuk M., Kolodziejczyk P. Survey of bioactive components in Western Canadian berries // Can.J.Physiol Pharmacol. 2007. N 85. P. 1139–1152.
- Berghofer L.K., Hocking A.D., Miskelly D., Jansson E. Microbiology of wheat and flour milling in Australia // Int. J. Food Microbiology. 2003. N 85. P. 137–149.
- Isaak C.K., Petkau J.C., Debnath S.C., Siow Y.L. Manitoba Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) Bioactivities in ischemia-reperfusion injury // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2015. N 63. P. 5660–5669.
- Joglekar M., Mandal M., Somaiah M.P., Murthy S. Comparative analysis of antioxidant and antibacterial properties of *Aegle marmelos*, *Coriandrum sativum* and *Trigonella foenum graecum* // Acta Biol. Indica. 2012. N 1(1). P. 105–108.
- Lehtonen H.M., Lindstedt A., Jarvinen R., Sinkkonen J., Graca G., Viitanen M. et al. ¹H NMR-based metabolic fingerprinting of urine metabolites after consumption of lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea*) with a high-fat meal // Food Chem. 2013. N 138. P. 982–990.
- Lindley M. The Impact of Food Processing on Antioxidants in Vegetable Oils, Fruits and Vegetables // Trends Food Sci. Technol. 1998. N 9. P. 336–340.
- Ma C. Y. Preparation, composition and functional properties of oat protein isolates // Can. Inst. Food Sci. Technol. 1983. N 16. P. 201–205.

- Nanditha B., Prabhasankar P. Antioxidants in Bakery Products: A Review Critical // *Reviews in Food Science and Nutrition*. 2009. N 49. P. 1–27.
- Negi P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application // *Journal of Food Microbiology*. 2012. N 156. P. 7–17.
- Reddy R.R.L., Srinivasan K. Hepatoprotective and antioxidant effect of fenugreek (*Trigonella Foenum-Graecum*) seeds in mice under lithogenic condition // *Journal of Food Biochemistry*. 2011. N 35. P. 1619–1626.
- Sajad A.W., Pradyuman K. Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2018. N 17. P. 97–106.
- Scott V.E. Stability of Whole Wheat Flour, Rolled Oats, and Brown Rice During Long-Term Storage and Preparation // *All Theses and Dissertations*. 2015. P. 6169. URL: <https://scholarsarchive.byu.edu/etd/6169/>
- Vybornov A.A., Anisimova L.V. Influence of grain processing method and type of packaging on storage stability of barley flour // *Food Processing: Techniques and Technology*. 2014. N 3(34). P. 11–16.
- Wani S.A., Solanke N., Kumar P. Akademik Gıda Effect of Fenugreek Seed Powder and Oat Flour Incorporation on Physical and Functional Properties of Extruded Product. 2015. N 13(1). P. 6–14.

УДК 577.15

О.В. Байбакова

*Институт проблем химико-энергетических технологий
Сибирского отделения Российской академии наук (Бийск, Россия)*

Осахаривание целлюлозосодержащих субстратов из мискантуса для биосинтеза бактериальной целлюлозы *

Исследован процесс осахаривания с помощью ферментных препаратов технических целлюлоз из мискантуса для биосинтеза бактериальной целлюлозы. В качестве сырья предложено использовать мискантус – энергетическую злаковую культуру с высоким приростом биомассы. Проведено два варианта двухстадийной предварительной химической обработки сырья: азотнокислым и комбинированным способами. Установлено, что выход редуцирующих веществ на стадии осахаривания выше для технической целлюлозы, полученной комбинированным способом.

Ключевые слова: мискантус, предварительная химическая обработка, осахаривание, ферментные препараты, бактериальная целлюлоза.

Бактериальная целлюлоза, продуцируемая симбиотической культурой *Medusomyces gisevii* (Chakravorty, 2016), имеет широкую область применения в медицине и в промышленности. Основными ограничениями применения бактериальной целлюлозы являются относительно низкая скорость производства и высокие затраты, связанные с получением питательной среды (Żywicka, 2018). Получение бактериальной целлюлозы в производственных условиях зависит от многих факторов, таких как наличие быстровоспроизводимого дешевого целлюлозосодержащего сырья, простота трансформации сырья в питательную среду, высокий выход целевого продукта и обе-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

спечение стандартности его качества. Учитывая перспективность использования бактериальной целлюлозы в различных отраслях промышленности, для создания крупномасштабного производства основной задачей является поиск подходящих источников сырья, имеющих низкую стоимость и не конкурирующих с пищевым сектором экономики (Schumann, 2009).

Учеными ИПХЭТ СО РАН предложено получать питательную среду из мискантуса – многолетней технической злаковой культуры. Это морфологически неоднородное сырье, состоящее из стеблей и листьев, соотношение которых может изменяться в зависимости от года и сбора урожая. В настоящее время мискантус признан перспективным источником целлюлозосодержащего сырья (Хие, 2016).

Целью данной работы являлось получение питательных сред для биосинтеза бактериальной целлюлозы осахариванием технических целлюлоз из мискантуса.

Предварительная химическая обработка мискантуса проводилась двумя способами с получением целлюлозосодержащих субстратов:

- 1) техническая целлюлоза (азотнокислый способ) была получена последовательной обработкой сырья 4 % раствором азотной кислоты при температуре 90–96 °С и атмосферном давлении в течение 1–6 ч на первой стадии и 4% раствором гидроксида натрия при температуре 90–96 °С и атмосферном давлении в течение 1–6 ч на второй стадии, после чего продукт отжимали на вакуум-филт্রে и промывали до нейтральной реакции (Budaeva, 2016);
- 2) техническая целлюлоза (комбинированный способ) была получена последовательной обработкой сырья 4 % раствором гидроксида натрия при температуре 90–96 °С и атмосферном давлении в течение 1–6 ч на первой стадии и 4 % раствором азотной кислоты при температуре 90–96 °С и атмосферном давлении в течение 1–6 ч на второй стадии, далее продукт отжимали на вакуум-филт্রে и промывали до нейтральной реакции (Budaeva, 2016).

Осахаривание проводилось в водной среде, в колбах Эрленмейера емкостью 1000 мл при начальной концентрации субстрата 40,0 г/л. Процесс осахаривания проводился при непрерывном переме-

шивании с частотой колебаний 150 мин⁻¹ в шейкере-инкубаторе «Unimax 1010». В работе использовались промышленно доступные ферментные препараты «Целлолюкс-А» (производитель ПО «Сиббиофарм», Бердск) и «Брюзайм ВGX» (производитель «Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша, для компании «Diadic International Inc.», США). Препарат «Целлолюкс-А» позиционируется на рынке как целлюлаза для расщепления некрахмалистых полисахаридов, «Брюзайм ВGX» – как гемицеллюлаза. Температура процесса осахаривания – 46–47 °С, продолжительность процесса – 48 ч, при этом активная кислотность поддерживалась вручную на уровне 4,7–4,9. Отбор проб для контроля концентрации редуцирующих веществ проводился каждые 8 ч. Концентрация редуцирующих веществ (РВ) в пересчете на глюкозу определялась спектрофотометрическим методом с помощью реактива на основе 3,5-динитросалициловой кислоты на «UNICO UV-2804». Выход РВ от массы субстрата рассчитан с учетом коэффициента 0,9, обусловленного присоединением молекулы воды к ангидроглюкозным остаткам соответствующих мономерных звеньев в результате ферментативного гидролиза. Полученные питательные среды после стадии осахаривания были отфильтрованы методом вакуумной фильтрации.

На стадии осахаривания наибольшая концентрация РВ достигнута для технической целлюлозы, полученной обработкой мискантуса комбинированным способом – концентрация составила $40,5 \pm 0,2$ г/л (выход РВ от массы субстрата – $90,9 \pm 0,2\%$). При осахаривании технической целлюлозы мискантуса, полученной азотнокислым способом, концентрация РВ снизилась на $8,8 \pm 0,1$ г/л и составила $31,7 \pm 0,2$ г/л (выход РВ от массы субстрата составил $71,2 \pm 0,2\%$). Таким образом, показана возможность получения питательных сред для биосинтеза бактериальной целлюлозы осахариванием технических целлюлоз из мискантуса.

Библиографический список

Budaeva V.V., Makarova, E.I., Gismatulina, Y.A. Integrated Flowsheet for Conversion of Non-Woody Biomass into Polyfunctional Materials // Key Engineering Materials. 2015. N 670. P. 202–206. URL: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.670.202>.

Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., Chakraborty W., Bhattacharya D., Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics // *International Journal of Food Microbiology*. 2016. N 220. P. 63–72. URL: <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.12.015>.

Schumann A.D., Wippermann J., Klemm O.D., Kramer F., Koth D., Kosmehl H., Wahlers T., Salehi-Gelan S. Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes // *Cellulose*. 2009. N 16. P. 877–885. DOI: 10.1007/s10570-008-9264-y.

Xue S., Lewandowski I., Wang X., Yi Z. Assessment of the production potentials of *Miscanthus* on marginal land in China // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016. N 54. P. 932–943 DOI: 932–943. DOI: 10.1016/j.rser.2015.10.040.

Żywicka A., Junka F.A., Szymczyk P., Chodaczek G., Grzesiak J., Sedghizadeh P.P., Fijałkowski K. Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil // *Carbohydrate Polymers*. 2018. N 199(1). P. 294–303 URL: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.126>.

УДК 579.66

О.В. Березина¹, С.В. Рыков¹, В.В. Зверлов^{2,3}, С.В. Яроцкий¹¹Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Москва, Россия)²Департамент микробиологии, Технический Университет г. Мюнхена (Фрайзинг, Германия)³Институт молекулярной генетики РАН (Москва, Россия)

Биосинтез гемицеллюлаз из *Aspergillus cervinus* в рекомбинантных штаммах *Escherichia coli* и *Pichia pastoris* *

Растительная биомасса является дешевым и возобновляемым источником сахаров для нужд промышленной биотехнологии. Ферментативный гидролиз – эффективный и экологически безопасный способ конверсии полисахаридов растительной биомассы в сахара. Химическое разнообразие растительных полисахаридов обуславливает необходимость использования широкого спектра ферментов для гидролиза. Природным источником гликозил-гидролаз являются различные виды микроскопических грибов. Однако уровень продукции индивидуальных ферментов природными штаммами чаще всего недостаточен для эффективного использования этих штаммов в промышленности и сельском хозяйстве. Рекомбинантные продуценты обладают рядом несомненных преимуществ, таких как повышенная продуктивность по целевому белку и минимальное количество балластных белков. Конструирование рекомбинантных штаммов-продуцентов гликозил-гидролаз на основе хозяйских микроорганизмов категории GRAS (Generally Recognizes As Safe) позволяет получить ферменты, свободные от токсичных примесей, которыми могут обладать природные продуценты. Национальный биоресурсный центр –

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014—2020 годы», соглашение о предоставлении субсидии № 14.628.21.0001.

Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (НБЦ ВКПМ) является хранилищем более 20 000 промышленных и генетически модифицированных штаммов микроорганизмов, предназначенных для использования в исследовательских и прикладных целях. В составе коллекции имеются микроскопические грибы-деструкторы растительной биомассы, которые могут служить источниками генов новых гликозил-гидролаз с промышленно-важными свойствами. Ранее в лаборатории технологического развития ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» были сконструированы рекомбинантные штаммы-продуценты гликозил-гидролаз из микроскопических грибов коллекции ВКПМ на основе реципиентов *Pichia pastoris* и *E.coli*. Целью данной работы было проведение сравнительной оценки эффективности гетерологичной экспрессии новых гемицеллюлаз из *Aspergillus cervinus* в *P. pastoris* и *E. coli* по уровню активности целевых ферментов и выбор реципиента, наиболее подходящего для биосинтеза грибных гликозил-гидролаз.

Ключевые слова: растительная биомасса, β -глюкан, ксилан, ксилан, грибные гликозил-гидролазы, гетерологичная экспрессия, *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*.

Введение. На протяжении многих лет гликозил-гидролазы широко используются в целлюлозно-бумажной и текстильной промышленности, для приготовления кормов и пищевых добавок, а также в процессах конверсии растительной биомассы в продукты с высокой добавленной стоимостью. Однако огромный потенциал использования этих ферментов раскрыт далеко не полностью вследствие многообразия растительных полисахаридов и отсутствия ферментных комплексов, специфичных для каждого типа сырья.

β -Глюканы – гетерогенная группа бактериальных, грибных и растительных полисахаридов, в которых остатки глюкозы соединены между собой β -(1,3)-, (1,4)- и (1,6)-гликозидными связями. β -Глюканы из разных источников отличаются молекулярным весом,

пропорциями и расположением гликозидных связей, длиной и структурой боковых цепей, частотой ветвления и прочими структурными модификациями, которые в совокупности определяют физиологические функции и биологическую активность полимеров (Synytsya and Novak, 2014). Ксилоглюкан – растительный структурный либо запасующий β -глюкан, остов которого состоит из целлотетрозных единиц, соединенных между собой 1,4- β -связями. В целлотетрозной единице три остатка глюкозы соединены 1,6- β -связью с боковыми цепями (остатком ксилозы или галактозы, декорированными фукозой или арабинозой), тогда как четвертый глюкозный остаток остается немодифицированным (Fry et al., 1993).

β -Глюканы, наряду с целлюлозой, являются основными полисахаридами клеточной стенки, особенно у молодых растений, и могут служить богатым источником сахаров. В процессе гидролиза β -глюканов специфические эндоглюканазы расщепляют их полисахаридный каркас до олигосахаридов (см. рис. 1). Полный ферментативный гидролиз целлюлозы с помощью только целлюлаз затруднен без предварительного гидролиза связующих β -глюканов.

Общепризнанным источником промышленных гликозил-гидролаз, включая эндо- β -глюканазы, являются различные виды микроскопических грибов. Природными продуцентами эндо- β -глюканаз являются, в частности, *Geotrichum sp.* (Yaoi and Mitsuishi, 2004), *Aspergillus japonicus*, *Chrysosporium lucknowense*, *Trichoderma reesei* (Grishutin et al., 2004; Markov et al., 2005; Qi et al., 2013), *Phanerochaete chrysosporium* (Ishida et al., 2007).

Методами селекции и радиационного мутагенеза получены штаммы, синтезирующие повышенные количества эндо- β -глюканаз: *Penicillium verruculosum* (RU 2361918), *Penicillium funiculosum* (RU 2323254), *Aspergillus aculeatus* (RU 2303057). Однако уровень продукции гликозил-гидролаз природными и мутантными штаммами чаще всего недостаточен для их эффективного использования в промышленности и сельском хозяйстве. Более того, природные штаммы могут производить помимо целевого продукта множество других ферментов и метаболитов, в том числе токсичных. Рекombинантные продуценты обладают рядом несомненных преимуществ, основным из которых является их повышенная продуктивность по целевому

белку. Конструирование рекомбинантных штаммов-продуцентов гликозил-гидролаз на основе хозяйских микроорганизмов категории GRAS (Generally Recognizes As Safe) позволяет получить ферменты, свободные от токсичных примесей.

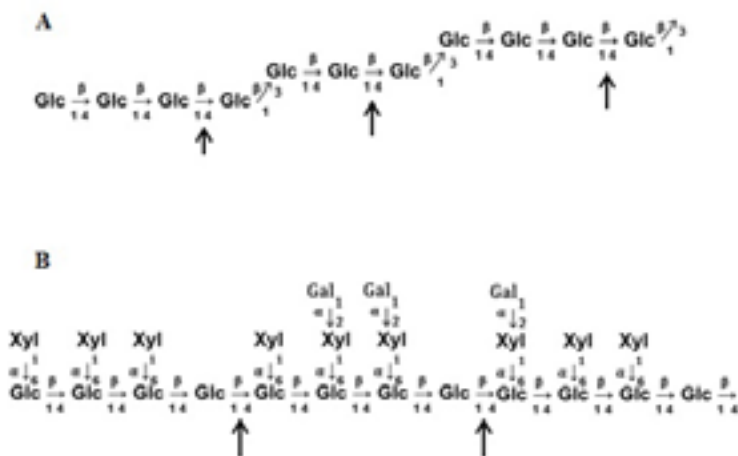


Рис. 1. Схематичное изображение β -глюкана ячменя (а) и ксилоглюкана из семян тамаринда (б), а также их расщепления эндо-(1,4)- β -глюканазами и эндо-ксилоглюканазами соответственно.

Национальный биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (НБЦ ВКПМ) является хранилищем более 20 000 промышленных и генетически модифицированных штаммов микроорганизмов, предназначенных для использования в исследовательских и прикладных целях. В составе коллекции находятся микроскопические грибы-деструкторы растительной биомассы, которые могут служить источниками генов новых гликозил-гидролаз с промышленно-важными свойствами. Ранее в лаборатории технологического развития ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» были сконструированы рекомбинантные продуценты гликозил-гидролаз из микроскопических

грибов коллекции ВКПМ на основе хозяйских микроорганизмов *Pichia pastoris* и *E. coli* (RU2639248; RU2625013; RU 2605629, Berezhina et al. 2017). Целью данной работы было проведение гетерологического микробного биосинтеза новых гемицеллюлаз из *Aspergillus cervinus* ВКПМ F-612 в *P. pastoris* и *E. coli* и оценка эффективности штаммов-продуцентов.

Материалы и методы исследований. В работе использовали штамм *P. pastoris* ВКПМ Y-4417 – продуцент эндо-(1,4)- β -глюканазы AsCeGH12A из *A. cervinus* ВКПМ F-612, а также штаммы *P. pastoris* ВКПМ Y-4299 и *E. coli* ВКПМ B-12683 – продуценты эндо-ксилоглюканазы AsCeGH12B из *A. cervinus* ВКПМ F-612. Штамм *E. coli* ВКПМ B-12683 культивировали на среде LB (мас. %: триптон – 1, дрожжевой экстракт – 0,5, NaCl – 1), содержащей 25 мг/мл канамицина, 34 мкг/мл хлорамфеникола и 25 мкг/мл стрептомицина, в ротационном шейкере-термостате при температуре 37 °C с аэрацией (200 об/мин). Выращивание посевного материала штаммов *P. pastoris* ВКПМ Y-4417 и *P. pastoris* ВКПМ Y-4299 проводили на среде BMGY (мас. %: пептон – 2, дрожжевой экстракт – 1, глицерин – 1, фосфатный буфер pH = 6,6 – до 100 mM, вода – остальное) в ротационном шейкере-термостате при температуре 29 °C с аэрацией (200 об./мин). Биосинтез целевых продуктов рекомбинантными штаммами *P. pastoris* проводили в колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды BMMY (мас. %: пептон – 2, дрожжевой экстракт – 1, метанол – 0,5, фосфатный буфер pH = 6,6 – до 100 mM, вода – остальное) при температуре 28 °C с интенсивной аэрацией (200–250 об./мин). Биомассу клеток отделяли от культивационной жидкости (КЖ) центрифугированием при 4000 об./мин. Для промывки биомассы *E. coli* после культивирования использовали натрий-фосфатный буфер (вес. %: NaCl – 0,8, KCl – 0,02, Na₂HPO₄ – 0,15, KH₂PO₄ – 0,024, остальное – вода). Для получения клеточного экстракта биомассу *E. coli*, ресуспендированную в натрий-фосфатном буфере (1:10 по объему), разрушали ультразвуком. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием при 14000 об/мин и отбрасывали.

Наличие рекомбинантных ксилоглюканазы AsCeGH12B или эндо-(1,4)- β -глюканазы AsCeGH12A в КЖ либо клеточном экстракте определяли с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с после-

дующей зимогаммой (Green and Sambrook, 2012). Количественную оценку уровня активности рекомбинантных ферментов в клеточном экстракте *E. coli* и в КЖ *P.pastoris* осуществляли при помощи ДНС-метода (Miller, 1959) с использованием в качестве субстратов β -глюкана ячменя и ксилоглюкана из семян тамаринда (Megazyme). За единицу активности в реакции гидролиза принимали 1 мкмоль высвободившихся редуцирующих сахаров в мин. Каждое измерение проводили не менее чем в трех повторностях, после чего определяли среднее значение. Ошибка измерений не превышала 5 %. В работе были использованы реактивы фирмы «Химмед», имеющие марку ХЧ и ЧДА.

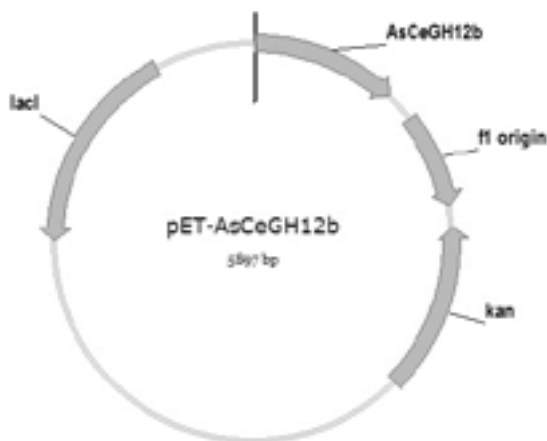


Рис. 2. Плазмидная конструкция для экспрессии гена эндо-ксилоглюканазы AsCeGH12B в *E. coli*

Результаты и обсуждение. Гены ферментов AsCeGH12A и AsCeGH12B были изолированы нами в предыдущих исследованиях из несеквенированного генома малоизученного гриба *Aspergillus cervinus* ВКПМ F-612 путем амплификации консервативных участков гена с помощью вырожденных праймеров и методами прогулки по хромосоме. Ген эндо-ксилоглюканазы AsCeGH12B был клонирован в состав плазмидного вектора pET-24a, разработанного для индуцируемой высокоэффективной экспрессии гомологичных и гетерологичных белков в *E.coli* (рис. 2) и в вектор pPICZaA, разработанный

для интеграции в штаммы *Pichia pastoris* и предназначенный для внеклеточной экспрессии (рис. 3). Полученные рекомбинантные плазмиды были использованы для конструирования штаммов *P. pastoris* ВКПМ Y-4299 и *E. coli* ВКПМ В-12683 – продуцентов эндо-ксилоглюканазы AsCeGH12B (RU2639248, RU2625013).

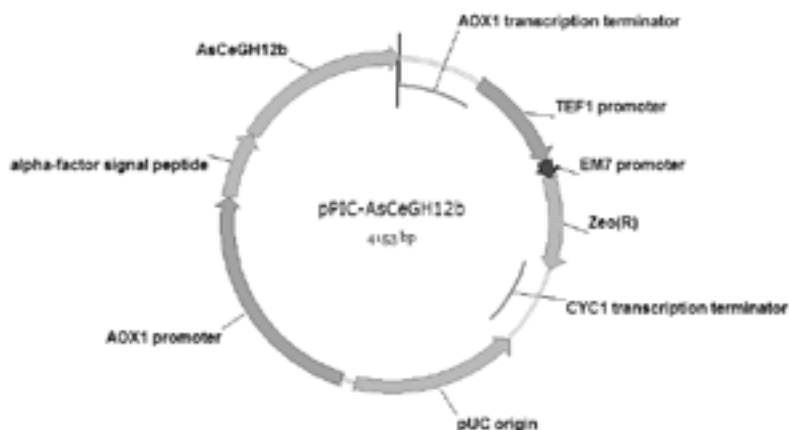


Рис. 3. Плазмидная конструкция для экспрессии гена эндо-ксилоглюканазы AsCeGH12B в *P. pastoris*

Биосинтез эндо-ксилоглюканазы AsCeGH12B в клетках рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-12683 начинали с подготовки посевного материала, представляющего собой культуру высокой плотности, выращиваемую в течение 16–18 ч с аэрацией на среде LB с соответствующими антибиотиками. Готовый посевной материал переносили в соотношении 1:100 (по объему) в среду LB с антибиотиками и культивировали до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,8-1,0$ ОЕ, после чего индуцировали синтез целевого белка путем добавления изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,1 мМ и продолжали культивирование в тех же условиях в течение 3–6 ч. Уровень активности рекомбинантной эндо-ксилоглюканазы в клетках *E. coli* ВКПМ В составил 0,3 ед/мл исходной культуры, что было даже меньше, чем у исходного штамма *A. cervinus* ВКПМ F-612 (1 ед./мл).

Посевной материал, представляющий собой культуру рекомбинантного штамма *P. pastoris* ВКПМ Y-4299 высокой плотности, подготавливали путем инкубации в течение 16–18 часов на среде BMGY, содержащей 1% глицерин в качестве единственного источника углерода. Затем выросшую культуру переносили в среду BMMY, в которой единственным источником углерода служит 1% метанол, являющийся одновременно индуктором синтеза целевого продукта. Процесс биосинтеза проводили в течение 96 часов, при этом каждые 24 часа в среду добавляли метанол до конечной концентрации 0,5%. Необходимым условием биосинтеза рекомбинантного белка является интенсивная аэрация. По истечении 96 часов биомассу отделяли центрифугированием, определяли уровень внеклеточной активности эндо-ксилоглюканазы. Он составил 30 ед./мл КЖ, что в 100 раз превышает уровень синтеза в *E. coli* и в 30 раз – природного штамма-продуцента *A. cervinus* ВКПМ F-612 (табл.).

Активность эндо-ксилоглюканазы и эндо-(1,4)- β -глюканазы в природном штамме *A. cervinus* ВКПМ F-612 и в рекомбинантных штаммах *E. coli* ВКПМ В-12683, *P. pastoris* ВКПМ Y-4299 и *P. pastoris* ВКПМ Y-4417

Активность, Ед/мл культуры Штамм	Эдо-ксило- глюканазная	Эндо-(1,4)- β - глюканазная
<i>A. cervinus</i> ВКПМ F-612 (AsCeGH12A, AsCeGH12B)	не измерялась	1
<i>E. coli</i> ВКПМ В-12683 (AsCeGH12B)	-	0,3
<i>P. pastoris</i> ВКПМ Y-4299 (AsCeGH12B)	-	30
<i>P. pastoris</i> ВКПМ Y-4417 (AsCeGH12A)	6	-

В исходных хозяйских штаммах *E. coli* BL21-CODONPLUS (DE3)-RIPL и *P. pastoris* X33 перечисленные активности отсутствовали. Поскольку уровень синтеза рекомбинантной ксилотрофной глюкогалактонидазы в мезофилотрофных дрожжах значительно превышал таковой в *E. coli*, гетерологичная экспрессия гена эндо-(1,4)- β -глюканазы AsCeGH12A была выполнена только в штамме *P. pastoris*. При использовании способа биосинтеза, аналогичного разработанному для фермента AsCeGH12B, уровень активности рекомбинантной эндо-(1,4)- β -глюканазы в КЖ штамма *P. pastoris* ВКПМ Y-4417 составил не менее 6 ед./мл.

Выбор метилотрофных дрожжей (МД) рода *Pichia* в качестве хозяйских штаммов для экспрессии грибных генов обоснован рядом преимуществ этих микроорганизмов как с научной, так и с технологической точек зрения. Клонлируемые в *E.coli* грибные гены часто требуют дополнительной оптимизации кодонного состава вследствие разной частоты использования кодонов в бактериальных и эукариотических организмах. Используемые для получения рекомбинантных ферментов бактериальные системы гетерологичной экспрессии, например, *E.coli*, могут иметь такие ограничения, как формирование нерастворимых телец включения и невозможность воспроизвести все посттрансляционные модификации, характерные для эукариот (гликозилирование, фосфорилирование, образование дисульфидных связей между цистеиновыми остатками). В отличие от *E.coli*, МД родов *Pichia*, *Komagataella* или *Hansenula* обладают способностью ко всем эукариотическим посттрансляционным модификациям, включая секрецию белков в культуральную среду. Невысокий уровень секреции эндогенных белков существенно облегчает выделение и очистку целевого рекомбинантного продукта из культивационной жидкости дрожжей (Macaulay-Patrick et al., 2005). Культуру МД можно выращивать в ферментерах до более высоких плотностей, по сравнению с традиционно используемыми дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, что позволяет повысить уровень продукции целевого белка (Gellissen, 2000). МД обладают одними из самых мощных в природе промоторов. Помимо МД, в качестве реципиентов для гетерологичной экспрессии грибных β -глюканаз используют различные штаммы грибов, например, *A. oryzae* (US 6500658), *Fusarium venenatum* (US 2004067569 A1), *Penicillium canescens* (RU 2358756), *A. niger* (WO 2014138983; Hasper et al., 2002). К недостаткам штаммов-продуцентов на основе микроскопических грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium* относят сложности с проведением генетических манипуляций на штаммах вследствие нестандартизированного и недостаточно разработанного генетического инструментария (Demain, Vaishnav, 2009), в то время как работа со штаммами МД лишена таких проблем.

Выводы. На примере эндо-ксилоглюканазы из *A. cervinus* было показано, что уровень гетерологичной экспрессии генов гликозил-гидролаз из *Aspergillus* в хозяйских штаммах *P. pastoris* суще-

ственно выше, чем в штаммах *E. coli*. Высокопродуктивные рекомбинантные штаммы *P. pastoris* – продуценты эндо-ксилоглюканазы и эндо-(1,4)- β -глюканазы из *A. cervinus* могут быть использованы для наработки этих ферментов в лабораторных количествах для их последующей характеристики. Новые грибные гемицеллюлазы могут найти применение в промышленной биотехнологии, а также в пищевой и кормовой отраслях. Олигосахариды, полученные из комплекса полисахаридов растительной клеточной стенки с использованием новых ферментов, могут найти применение в медицине, фармацевтике и для производства нутрицевтиков. Известно, что некоторые растительные олигосахариды обладают иммуномодулирующими/стимулирующими, пребиотическими, антибиотическими, противовирусными, противоопухолевыми, антипаразитическими, антикоагуляционными, антинейродегенеративными свойствами, а также могут снижать уровень липидов и холестерина. Потенциальная возможность существования перечисленных свойств у олигосахаридов, полученных из ксилотриканов и β -глюканов делает их интересными объектами для изучения и последующего использования.

Библиографический список

- Berezina O.V., Herlet J., Rykov S.V., Kornberger P., Zavyalov A., Kozlov D., Yarotsky S.V. Thermostable multifunctional GH74 xyloglucanase from *Myceliophthora thermophila*: High-level expression in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant protein // Applied microbiology and biotechnology. 2017. N 101(14). P. 5653–5666. DOI: 10.1007/s00253-017-8297-2.
- Demain A.L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms // Biotechnology advances. 2009. N 27(3). P. 297–306. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.
- Fry S.C., York W.S., Albersheim P., Darvill A., Hayashi T., Joseleau J.P., White A.R. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides // Physiologia plantarum. 1993. N 89(1). P. 1-3. DOI:10.1111/j.1399-3054.1993.tb01778.x.
- Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts // Applied microbiology and biotechnology. 2000. N 54(6). P. 741–750.
- Green M. R., Sambrook J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual.

- (Fourth Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012.
- Grishutin S.G., Gusakov A.V., Dzedyulya E.I., Sinitsyn A.P. A lichenase-like family 12 endo-(1-4)-beta-glucanase from *Aspergillus japonicus*: study of the substrate specificity and mode of action on beta-glucans in comparison with other glycoside hydrolases // Carbohydrate research. 2006. N 341(2). P. 218–229. DOI:10.1016/j.carres.2005.11.011.
- Hasper A.A., Dekkers E., van Mil M., van de Vondervoort P.J., de Graaff L.H. EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan // Applied and environmental microbiology. 2002. N 68(4). P. 1556–60.
- Ishida T., Yaoi K., Hiyoshi A., Igarashi K., Samejima M. Substrate recognition by glycoside hydrolase family 74 xyloglucanase from the basidiomycete // *Phanerochaete chrysosporium*. The FEBS journal. 2007. N 274(21). P. 5727–5736.
- Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., McNeil B., Harvey L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system // Yeast. 2005. N 22(4). P. 249–270. DOI: 10.1002/yea.1208.
- Markov A.V., Gusakov A.V., Kondratyeva E.G., Okunev O.N., Bekkarevich A.O., Sinitsyn A.P. New effective method for analysis of the component composition of enzyme complexes from *Trichoderma reesei* // Biochemistry. 2005. N 70(6). P. 657–663.
- Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Analytical Chemistry. 1959. N 31(3). P. 426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
- Synitsya A., Novak M. Structural analysis of glucans // Annals of translational medicine. 2014. N 2(2). P. 17. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07.
- Yaoi K., Mitsuishi Y. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression of a xyloglucan endoglucanase from *Geotrichum* sp. M128 // FEBS letters. 2004. N 560(1-3). P. 45-50. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00068-7.
- RU 2303057. Штамм мицелиального гриба *Aspergillus aculeatus* – продуцент комплекса карбогидраз, содержащего ксиланазы, бета-глюконазы, пектиназы и ксилотриазы. Дата приоритета: 14.11.2005.
- RU 2323254. Штамм мицелиального гриба *Penicillium funiculosum* – продуцент комплекса карбогидраз, содержащего целлюлазы, глюка-

назы, глюкозидазы, ксиланазы и ксилоглюканазы, и способ получения ферментного препарата комплекса карбогидраз для осахаривания лигноцеллюлозных материалов. Дата приоритета: 04.04.2006.

RU 2358756. Способ получения ферментного препарата для расщепления гемицеллюлозных гетерополисахаридов клеточной стенки растений и ферментный препарат (варианты). Дата приоритета: 26.11.2007.

RU 2361918. Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* – продуцент комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы и способ получения ферментного препарата комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы. Дата приоритета: 26.02.2008.

RU 2605629. Рекомбинантный штамм дрожжей *Pichia pastoris* – продуцент секретируемой термостабильной ксилоглюканазы, кодируемой синтетическим геном, и способ микробиологического синтеза секретируемой термостабильной ксилоглюканазы на основе этого штамма. Дата приоритета: 16.12.2015.

RU2625013. Рекомбинантный штамм *Escherichia coli* – продуцент ксилоглюканазы из гриба *aspergillus cervinus* и способ микробиологического синтеза ксилоглюканазы на основе этого штамма. Дата приоритета: 28.06.2016.

RU2639248. Рекомбинантный штамм дрожжей *Pichia pastoris* – продуцент секретируемой ксилоглюканазы из гриба *Aspergillus cervinus* и способ микробиологического синтеза ксилоглюканазы на основе этого штамма. Дата приоритета: 15.12.2016.

US 6500658 // Xyloglucanase from *Malbranchea*. Priority date: US20000653778 20000901; WO2000DK00450 20000811; US19990149397P 19990817.

US 2004067569 A1. Polypeptides having xyloglucanase activity and nucleic acids encoding same. Priority date: US20030420191 20030418; US20020373987P 20020419.

WO 2014138983 A1. Novel cell wall deconstruction enzymes of *Malbranchea cinnamomea*, *Thielavia australiensis*, and *Paecilomyces byssochlamydoides*, and uses thereof. Priority date: US201361783222P 20130314; US201361783313P 20130314; US201361783485P 20130314.

УДК 665.383.3

С.А. Бобровская, Е.Ю. Шумилова, А.В. Протопопов

*Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова (Барнаул, Россия)*

Полимеризация подсолнечного масла, выделенного из отходов маслоэкстракционного производства

Исследован процесс окисления и полимеризации подсолнечного масла, полученного с отбельных земель. Проведены серии опытов процесса окисления в химическом реакторе. Продукты проведенных исследований позволят перерабатывать опасные отходы маслоэкстракционного производства в композиционные материалы различного назначения, поверхностно-активных веществ, эмульгаторов, смягчающих веществ и смазочных материалов.

Ключевые слова: растительные масла, окисление масел, полимеризация масел, отбельные земли.

На производство лакокрасочных материалов (ЛКМ) в России используются 100 тысяч тонн растительных масел, из которых 85–90% являются пищевыми растительными маслами. Около 50% изготавливаемых ЛКМ в качестве главного пленкообразователя содержат растительные масла либо продукты их переработки. В последние годы отмечается снижение производства и существенное увеличение стоимости растительных масел (Хвастухин, 2005).

Растительные масла применяют в лакокрасочной, полиграфической, легкой, строительной промышленности и других отраслях народного хозяйства.

В лакокрасочной промышленности растительные масла используют для получения масляных красок и олиф на их основе, а также для синтеза алкидных смол с последующим изготовлением эмалей и лаков. Расход растительных масел на производство одной тонны

олиф в среднем больше, чем на одну тонну алкидов.

В технике приготовления масляно-смолистых лаков, олиф и эмалевых красок имеет значение процесс полимеризации масел, определяющий малярно-технические качества продукта. В связи с этим актуальность выбранной темы заключается в проведении исследования по изучению состава отхода отбельных земель и способов модификации растительных масел, содержащихся в них, с целью получения практически востребованных материалов.

Улучшение качества покрытия и увеличение скорости пленкообразования достигается после следующих видов обработки: оксидирования, полимеризации, дегидратации, эпоксидирования, а также модификации другими непредельными соединениями (Камышан, 2004).

Данная работа посвящена изучению процессов окисления и полимеризации подсолнечного масла, полученного экстракцией с отбельных земель маслоэкстракционного производства.

Практическая ценность проведенных исследований при полимеризации масел позволит перерабатывать опасные отходы маслоэкстракционного производства в композиционные материалы различного назначения, поверхностно-активные вещества, эмульгаторы, смягчающие вещества и смазочные материалы.

При проведении исследования нами было использовано подсолнечное масло, полученное экстракцией в аппарате Сокслетта хлороформом с отбельных земель маслоэкстракционного производства с ООО «Юг Сибири».

Для изучения процессов окисления, оксидирования и эпоксидирования нами были проведены серии опытов процесса окисления в химическом реакторе, представляющем собой круглодонную колбу, снабженную механической мешалкой. Прохождение реакции контролировали по йодкрахмальной бумаге.

1. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 0,5 г КОН и заливали 4 мл перекиси водорода и 20 мл C_2H_5OH , окисление проводили при температуре 70 °С в течение двух часов, в результате получили твердый продукт желтого цвета.

2. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла и заливали 2 мл перекиси водорода, окисление проводили при температуре 70 °С. По истечении одного часа окисления добавили 2 мл H_2SO_4 , затем

окисляли в течение 1,5 ч, в результате получили вязко-текучий продукт желтого цвета.

3. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла и 1 г $\text{Mg}(\text{CLO}_4)_2$, окисление проводили при температуре 120 °С в течение двух часов, в результате получили жидкий продукт красно-желтого цвета.

4. В колбу помещали 10 г подсолнечного масла и 2 г $\text{Mg}(\text{CLO}_4)_2$, окисление проводили при температуре 120 °С в течение трех часов, в результате получили жидкий продукт темно-коричневого цвета.

5. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 1 г КОН и заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, окисление проводили при температуре 70 °С. По истечению 30 минут добавляли 2 мл перекиси для поддержания процесса окисления, выдерживали в течение двух часов. В результате получили твердый продукт оранжевого цвета.

6. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла и 1 г $\text{Mg}(\text{CLO}_4)_2$ и заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, окисление проводили при температуре 70 °С в течение двух часов, в результате получили жидкий прозрачный продукт.

7. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 1 г КОН и заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, окисление проводили при температуре 70 °С. По истечении 60 минут добавляли 1 г PbO_2 , через 20 минут продукт затвердел и приобрел бледно-желтый цвет.

8. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 1 г КОН и заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, окисление проводили при температуре 70 °С. По истечении 60 минут добавляли 1 г $\text{Mg}(\text{CLO}_4)_2$, проводили полимеризацию в течение одного часа, в результате продукт затвердел и приобрел желтый цвет.

9. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 1 г КОН и заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, окисление проводили при температуре 70 °С. По истечении 60 минут повышали температуру до 90°С для удаления спирта, после 15 минут добавляли 0,5 г PbO_2 , через 20 минут продукт затвердел и приобрел бледно-желтый цвет.

10. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 1 г КОН и заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, окисление проводили при температуре 70 °С. По истечении 60 минут добавляли 1 г мочевины и окисляли 1 часа, в результате получили твердый продукт желтого цвета.

11. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 1 г КОН и заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл C_2H_5OH , окисление проводили при температуре 70 °С. По истечении 60 минут проводили процесс барботирования в течение двух часов, в результате получили твердый продукт светло-желтого цвета.

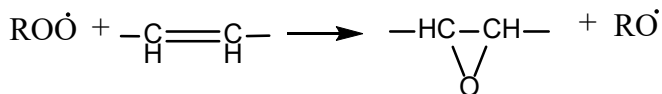
12. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 1 г $Mg(CLO_4)_2$, заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл C_2H_5OH , окисление проводили при температуре 70 °С. По истечении 60 минут проводили процесс барботирования в течение двух часов, в результате получили жидкий продукт желтого цвета.

13. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 0,5 г КОН и заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл C_2H_5OH , окисление проводили при температуре 70 °С. По истечении 60 минут проводили процесс барботирования в течение двух часов, в результате получили твердый продукт белого цвета.

14. В колбу помещали 5 г подсолнечного масла, 0,5 г $Mg(CLO_4)_2$, и заливали 2 мл перекиси водорода и 20 мл C_2H_5OH , окисление проводили при температуре 70°С. По истечении 60 минут проводили процесс барботирования в течение двух часов, в результате получили жидкий продукт желтого цвета.

При окислении масел в молекуле жирных кислот повышается содержание различных функциональных групп, в том числе и карбоксильных, поэтому возрастают кислотное число и число омыления масла.

Образование эпоксидных соединений происходит в результате взаимодействия пероксидных радикалов по двойным связям (Сорокин, 1989):



Образующиеся соединения подвергаются дальнейшим превращениям, в результате чего в реакционной массе могут проявляться реакции переэтерификации и полимеризации.

Таким образом, окисление масел приводит к изменениям в структуре и составе триглицеридов, существенным для последующего пленкообразования: изомеризации двойных связей в сопря-

женное положение, олигомеризации триглицеридов и накоплению гидропероксидов (Акаева, 2008).

В ходе работы были проведены исследования по изучению состава отхода отбелных земель и способов модификации подсолнечного масла, содержащегося в них, с целью получения практически востребованных композиционных материалов, поверхностно-активных веществ, эмульгаторов, смягчающих веществ и смазочных материалов.

В качестве модельного объекта исследования выбрано нерафинированное подсолнечное масло как наиболее близкое по составу к маслам, содержащимся в отбелных землях.

Результаты хроматографии показали, что основными компонентами являются олеиновая и пальмитиновая кислоты. В отличие от исходного масла выявлено низкое содержание линолевой кислоты, следовательно, необходимо проводить предварительное глубокое окислирование для улучшения прохождения процесса полимеризации (ГОСТ 30418-96). Результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Жирно-кислотный состав подсолнечного масла, %

Наименование жирной кислоты	Массовая доля жирной кислоты по ГОСТу	Массовая доля жирной кислоты по хроматографу
C _{14:0} Тетрадекановая (миристиновая)	До 0,2	0,373
C _{16:0} Гексадекановая (пальмитиновая)	5,0-7,6	21,306
C _{16:1} Гексадеценная (пальмитолеиновая)	До 0,3	0,432
C _{18:0} Октадекановая (стеариновая)	2,7-6,5	16,400
C _{18:1} Октадеценная (олеиновая)	14,0-39,4	33,879
C _{18:2} Октадекадиеновая (линолевая)	48,3-77,0	14,818
C _{18:3} Октадекатриеновая (линоленовая)	До 0,3	0,359
C _{20:0} Эйкозановая (арахиновая)	До 0,5	1,296

Наименование жирной кислоты	Массовая доля жирной кислоты по ГОСТу	Массовая доля жирной кислоты по хроматографу
C _{20:1} Эйкозеновая (гондоиновая)	До 0,3	1,825
C _{22:0} Докозановая (бегеновая)	0,3-1,5	1,234
C _{22:1} Докозановая (эруковая)	До 0,2	1,199
C _{24:0} Тетракозановая (лигноцериновая)	До 0,5	0,481

На модельном объекте первоначально была отработана и выбрана система для окислирования и эпоксилирования подсолнечного масла. Исследования проводились с использованием различных систем, данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

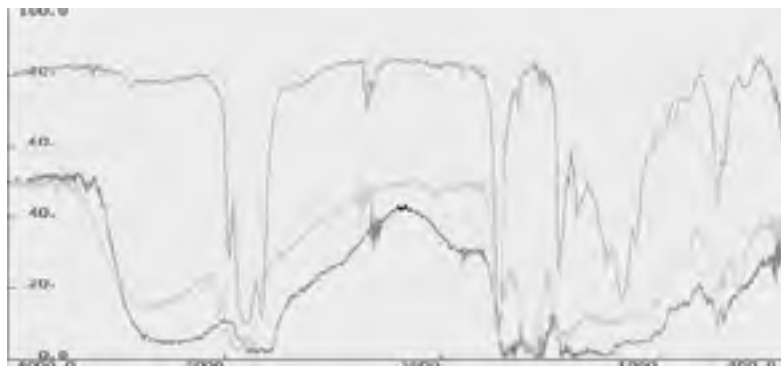
Значение йодного числа подсолнечного масла
при различных способах окисления

Способ окисления	Состояние продукта	Йодное число
подсолнечное масло - KOH - H ₂ O ₂ - C ₂ H ₅ OH, t= 70°C, τ=2ч	Твердый, желтого цвета	384
подсолнечное масло - KOH - H ₂ O ₂ - H ₂ SO ₄ , t= 70°C, τ=2,5ч	Вязко-текучий т, желтого цвета	134
подсолнечное масло - Mg(CLO ₄) ₂ (5:1), t= 120°C, τ=2ч	Жидкий, красно-желтого цвета	250
подсолнечное масло - Mg(CLO ₄) ₂ (10:2), t= 120°C, τ=3ч	Жидкий, темно-коричневого цвета	287
подсолнечное масло - H ₂ O ₂ - Mg(CLO ₄) ₂ - C ₂ H ₅ OH, t= 70°C, τ=2,5ч	Жидкий, прозрачный	210,5
подсолнечное масло - KOH - H ₂ O ₂ - C ₂ H ₅ OH - Mg(CLO ₄) ₂ , t= 70°C, τ=2ч	Твердый, желтого цвета	252,5
подсолнечное масло - KOH - H ₂ O ₂ - C ₂ H ₅ OH - PbO ₂ , t= 70°C, τ= 1,2ч	Твердый, бледно-желтого цвета	308
подсолнечное масло - KOH - H ₂ O ₂ - C ₂ H ₅ OH - PbO ₂ , t= 70°C, t= 90°C, τ= 1,35ч	Твердый, бледно-желтого цвета	340

Способ окисления	Состояние продукта	Йодное число
подсолнечное масло – KOH – H ₂ O ₂ – C ₂ H ₅ OH – мочеви́на, t= 70°C, τ= 2ч	Твердый, желтого цвета	253
подсолнечное масло – KOH – H ₂ O ₂ – C ₂ H ₅ OH (5:0,5:2:20), t= 70°C, τ=3ч, барбота́ж	Твердый, белого цвета	202
подсолнечное масло – KOH – H ₂ O ₂ – C ₂ H ₅ OH (5:1:2:20), t= 70°C, τ=3ч, барбота́ж	Твердый, светло- желтого цвета	340
подсолнечное масло – Mg(CLO ₄) ₂ – H ₂ O ₂ – C ₂ H ₅ OH (5:0,5:2:20) , t= 70°C, τ=3ч, барбота́ж	Жидкий, желтого цвета	142
подсолнечное масло – Mg(CLO ₄) ₂ – H ₂ O ₂ – C ₂ H ₅ OH (5:1:2:20), t= 70°C, τ=3ч, барбота́ж	Жидкий, желтого цвета	191

Исходя из полученных данных можно сделать заключение, что лучше всего процесс окисления проходит в системе «подсолнечное масло – KOH – C₂H₅OH – H₂O₂». Значение йодного числа выше 300 свидетельствует о протекании процесса окисления с увеличением вязкости и, как следствие, замедлением подвода реакционных частиц.

Анализ ИК-спектров (рис.) полученных продуктов окисления масла показал увеличение интенсивности полосы поглощения в области 3600 см⁻¹, характерной для колебаний гидроксильной группы, появление полосы поглощения в области 1560 см⁻¹, ответственной за колебания карбоксильной группы солей жирных кислот, и полосы поглощения в области 3800 см⁻¹, характерной для димеров жирных кислот. Одновременно исчезает полоса поглощения в области 3000 см⁻¹, ответственная за метильные группы, и увеличивается полоса поглощения в области 2900 см⁻¹, ответственная за колебания метиленовых групп (Казицина, 1979). Итак, ИК-методом установлено, что окислительный агент – H₂O₂ взаимодействует с жирными кислотами подсолнечного масла с образованием эпоксидного цикла. Впоследствии они распадаются с образованием двойной связи (Сильверстейн, 1977). Приведенные данные свидетельствуют о проходящем процессе деацилирования триглицеридов жирных кислот и их окислении.



ИК-спектры подсолнечного масла и продуктов его окисления

Полученные окисленные масла после удаления растворителя характеризуются высокой вязкостью и по консистенции представляют собой пастообразный продукт. Такие окисленные масла можно применять как смазочные материалы, а также они представляют интерес как пластификаторы для полимерных композитов и компоненты для получения сополимеров.

Итак, проведенные исследования показывают возможность получения композиционных материалов путем конденсации высших жирных кислот масложирового остатка на адсорбентах маслоочистки. Эффективность данного исследования заключается в том, что предлагается комплексная переработка отходов адсорбентов маслоэкстракционного производства, что позволяет перевести опасный отход отбельных земель в полезное сырье для получения композиционных материалов различного назначения, поверхностно-активных веществ, эмульгаторов, смягчающих веществ и смазочных материалов.

Библиографический список

- Акаева Т.К., Козлов В.А. Химия и технология пленкообразующих веществ. Иваново, 2008. 100 с.
- ГОСТ 30418-96 Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава.
- Казицина Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ, ИК, ЯМР и мамм-спектроскопии в органической химии. М., 1979. 240 с.

- Камышан Е. М., Адсорбционная очистка растительных масел // Масложировая промышленность. 2004. № 1. С. 44–45.
- Сильверстейн Р., Бассер Г., Морит Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений. М., 1977. 590 с.
- Сорокин М.Ф., Кочнова З.А., Шодэ Л.Г. Химия и технология пленкообразующих веществ. М., 1989. 480 с.
- Хвастухин Ю.И., Костогрыз К.П., Копейченко А.Г., Роман С.Н., Когу-та Н.К., Собченко В.В. Утилизация отходов масложировых комбинатов // Наукові праці ОНАХТ. 2007. Вип. 30. С. 200–205.

УДК 577.114

Д.С. Голубев, Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба, Н.В. Бычин

*Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского
отделения Российской академии наук (Бийск, Россия)*

Термический анализ бактериальной целлюлозы, полученной на ферментативных гидролизатах мискантуса *

Изучен процесс термической потери массы образцов бактериальной целлюлозы, синтезированных на средах ферментативных гидролизатов мискантуса. Термогравиметрические кривые образцов бактериальной целлюлозы, полученные на разных питательных средах, имели схожий профиль. Кривые дифференциального термического анализа схожи для всех образцов, кроме образца бактериальной целлюлозы, выращенного на ферментативном гидролизате продукта щелочной делигнификации мискантуса. Наибольшую термостабильность показал образец бактериальной целлюлозы, синтезированный на среде из ферментативного гидролизата технической целлюлозы, полученной комбинированным способом.

* Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, *Medusomyces gisevii*, мискантус, химическая предварительная обработка, ферментативный гидролизат, термогравиметрический анализ, дифференциальный термический анализ.

Введение. Целлюлоза – линейный полимер, состоящий из молекул глюкозы соединенных β -1,4-гликозидной связью, является самым распространенным биополимером на Земле. Классические источники целлюлозы хорошо изучены, тем не менее продолжают оставаться объектами современных исследований. А такой уникальный по структурной форме объект, как бактериальная целлюлоза, синтезируемая рядом микроорганизмов, находится в эпицентре ультрасовременных исследований и имеет множество биомедицинских и промышленных приложений.

БЦ имеет сетчатую структуру, которая состоит из случайно ориентированных волокон, имеющих форму лент шириной от 30 до 100 нм (Klemm, 2005), т.е. является наноцеллюлозой. БЦ не содержит в своем составе примесей, характерных для растительной целлюлозы (лигнина, гемицеллюлозы и др.). В некоторых областях применения БЦ сталкиваются с проблемой предела тепловых возможностей данного материала, например, применение в качестве «умного» гидрогеля, резко изменяющего степень набухания в зависимости от изменений pH и температуры (Alosmanov, 2017). Такие «умные» гидрогели используются в медицине (Hezaveh, 2012) и тканевой инженерии (Rosso, 2005), поэтому важно оценить их поведение под воздействием тепловых нагрузок.

Исследование предела тепловых возможностей материалов может проводиться двумя методами термического анализа. Термогравиметрический анализ (ТГА) заключается в регистрации изменения массы исследуемого материала в зависимости от температуры, что позволяет оценить термостабильность. При дифференциальном термическом анализе (ДТА) измеряется температура объекта в сравнении с температурой эталона. При этом термопары, измеряющие температуру эталона и объекта, включены дифференциально.

Целью данной работы является термический анализ образцов бактериальной целлюлозы, полученных на средах ферментативных гидролизатов мискантуса.

Материалы и методы исследования. Биосинтез БЦ производился на четырех питательных средах, полученных из мискантуса сорта Сорановский (Капустянчик, 2016). Субстраты получены на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН одним из следующих способов:

- 1) одностадийная обработка азотной кислотой с получением продукта азотнокислой обработки (ПАО) (Skiba, 2017);
- 2) двухстадийная обработка азотной кислотой с последующей обработкой гидроксидом натрия с получением технической целлюлозы азотнокислым способом (ТЦ АС) (Budaeva, 2016);
- 3) одностадийная обработка гидроксидом натрия с получением продукта щелочной делигнификации (ПЩД) (Skiba, 2017);
- 4) двухстадийная обработка гидроксидом натрия с последующей обработкой азотной кислотой с получением технической целлюлозы комбинированным способом (ТЦ КС) (Budaeva, 2016).

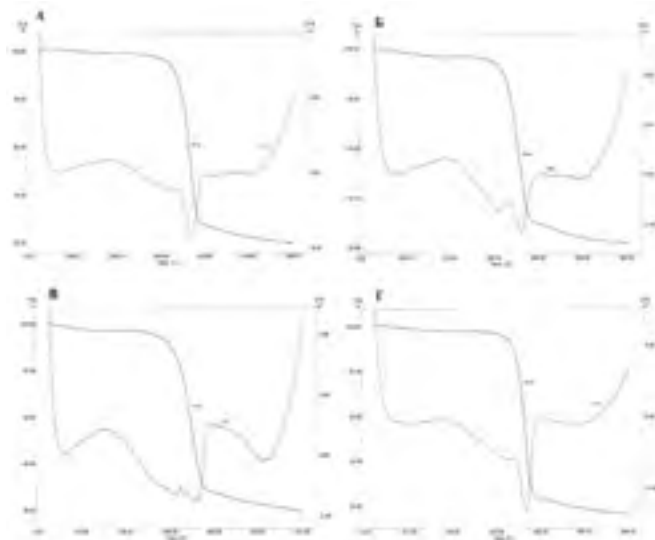
Полученные субстраты подвергались ферментативному гидролизу в одинаковых условиях (Makarova, 2017).

Гидролизаты стандартизованы по глюкозе для получения концентрации 20 г/л, чай вносился в гидролизную среду в количестве 10 г/л. В качестве продуцента использовалась симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12. Культивирование производилось при температуре 27 °С в стационарных условиях в течение 14 суток (Gladysheva, 2018). Полученные пленки БЦ промывались разбавленными растворами гидроксида натрия и соляной кислоты, после чего отмывались в дистиллированной воде до нейтрального значения pH. Высушивались на воздухе в расправленном состоянии.

Термический анализ проводился на термогравиметрическом анализаторе DTG-60 (Shimadzu, Japan), исследуемый образец нагревался со скоростью 10 °С/мин до максимальной температуры 600 °С. Среда инертная – азот, расход газа – 40мл/мин, масса образца – 2 мг.

Результаты и обсуждение. Анализ кривых ТГА и ДТА, представленных на рисунке, показывает, что все образцы БЦ имеют схожий характер термической потери массы. В диапазоне температур от 25 до 180 °С потеря массы ΔP_1 происходит из-за испарения адсорбированной воды и сопровождается небольшим эндотермическим пиком, при этом физически связанная вода в основном адсорбируется

на аморфных областях полимера, кристаллические области обычно не поглощают воду (Vyas, 2004). По потере воды образцы можно расположить в следующий ряд: ТЦ АС>ПЩД>ТЦ КС>ПАО.



Термогравиметрические и дифференциально термические кривые:

А – ПАО; Б – ТЦ АС; В – ПЩД; Г – ТЦ КС

Далее в диапазоне от 180 до 400 °С происходит наибольшая потеря массы ΔP_2 , связанная с процессами деградации целлюлозы, такими как деполимеризация, дегидратация и разложение гликозильных звеньев с образованием трудно разлагаемого остатка. На всех кривых ДТА, кроме ферментативного гидролизата ПЩД, эта стадия происходит в два этапа – $\Delta P_{2,1}$ и $\Delta P_{2,2}$, каждый из которых характеризуется эндотермическим пиком разложения. От 400 °С до 500 °С изменение массы образца ΔP_3 сопровождается небольшим экзотермическим пиком. От 500 до 600 °С изменение массы образца ΔP_4 невелико и сопровождается изменением теплоёмкости негорячего остатка. Данные о потере массы на каждой стадии занесены в таблицу.

Потеря массы образца на каждой стадии

Образец	ΔP_1 %	$\Delta P_{2.1}$ % Фаза 1	$\Delta P_{2.2}$ % Фаза 2	ΔP_2 % сумма	ΔP_3 %	ΔP_4 %	ΔP_5 % остаток
ПАО	1,76	9,80	61,95	71,75	4,98	2,70	18,81
ТЦ АС	3,33	16,05	50,78	66,83	6,01	1,95	21,88
ПЩД	2,95	68,93	Фазы не раз- делены	68,93	5,46	2,95	19,71
ТЦ КС	2,63	7,83	66,53	74,36	4,36	2,38	16,27

Из исследуемых образцов наибольшую температуру начала пиролиза показала БЦ, полученная на ферментативном гидролизате ТЦ КС, следовательно, этот образец характеризуется наибольшей термостабильностью из всех опытных образцов. Кроме того, он обладает большей термостабильностью, чем некоторые традиционные источники целлюлозы, например, большей, чем хлопок (Вершинин, 2017).

Таким образом был исследован процесс термической потери массы образцов БЦ, синтезированных продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 на средах ферментативных гидролизатов мискантуса, различающихся методами предварительной химической обработки. Термогравиметрические кривые имеют схожий профиль для всех образцов, кривые дифференциального термического анализа схожи для всех, кроме образца БЦ, выращенного на ферментативном гидролизате продукта щелочной делигнификации, имеющего менее выраженную первую стадию пиролиза, что может быть связано с степенью его поликристалличности, чистоты и механического состояния волокон. Было показано, что анализируемые образцы обладают высокой термостабильностью, по данному показателю их можно расположить в следующий ряд: ТЦ КС>ПАО>ТЦ АС>ПЩД.

Библиографический список

Вершинин М.С., Гараева М.Р., Мингазова В.К. Исследование термических характеристик целлюлоз, полученных из растительного сырья // Приволжский научный вестник. 2017. N 3(67). С. 10–13.

Капустянчик С.Ю., Лихенко И.Е., Данилова А.А. Productivity of miscanthussoranovski variety of the first year of vegetation and soil respiratory activity // Пермский аграрный вестник. 2016. N 4 (16). С. 82–87.

Alosmanov R., Wolski K., Zapotoczny S. Grafting of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) from wet bacterial cellulose sheets to improve its swelling-drying ability // Cellulose. 2017. N 24(1). P. 285–293. URL: <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1120-x>.

Budaeva V.V., Makarova E.I., Gismatulina Y.A. Integrated Flowsheet for Conversion of Non-Woody Biomass into Polyfunctional Materials // Key Engineering Materials. 2015. N 670. P. 202–206. URL: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.670.202>.

Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomycesgisevii* Sa-12 // Applied Biochemistry and Microbiology. 2018. N 54(2). P. 179–187. URL: <https://doi.org/10.1134/S0003683818020035>.

Hezaveh H., Muhamad I.I. Effect of natural cross-linker on swelling and structural stability of kappa-carrageenan/hydroxyethyl cellulose pH-sensitive hydrogels // Korean Journal of Chemical Engineering. 2012. N 29(11). P. 1647–1655. URL: <https://doi.org/10.1007/s11814-012-0056-6>.

Klemm D., Heublein B., Fink H.-P., Bohn A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material // Angewandte Chemie International Edition. 2005. N 44(22). P. 3358–3393. URL: <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>.

Makarova E.I., Budaeva V.V., Kukhlenko A.A., Orlov S. E. Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis of *Miscanthus* and oat hulls // Biotech. 2017. N 7(5). URL: <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0964-6>.

Pa N., HarfizSalehudin M., Diana Hassan N., MohdMarsin A., Idayu Muhamad I. Thermal Behavior of Bacterial Cellulose Based Hydrogels with Other Composites and Related Instrumental Analysis. 2018.. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0_26-1.

Rosso F., Marino G., Giordano A., Barbarisi M., Parmeggiani D., Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering // Journal of Cellular Physiology. 2005. N 203(3). P. 465–470. URL: <https://doi.org/10.1002/jcp.20270>.

Skiba E.A., Baibakova O.V., Budaeva V.V., Pavlov I.N., Vasilishin M.S., Makarova E.I., Chumachenko V.A. Pilot technology of ethanol production from oat hulls for subsequent conversion to ethylene // Chemical Engineering Journal. 2017. N 329. P. 178–186. URL: <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2017.05.182>.

Skiba E.A., Budaeva V.V., Baibakova O.V., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Dilute nitric-acid pretreatment of oat hulls for ethanol production // Biochemical Engineering Journal. 2017. N 126. P. 118–125. URL: <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2016.09.003>.

Vyas S., Pradhan S. D., Pavaskar N. R., Lachke A. Differential thermal and thermogravimetric analyses of bound water content in cellulosic substrates and its significance during cellulose hydrolysis by alkaline active fungal cellulases // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2004. N 118(1–3). P. 177–188. URL: <https://doi.org/10.1385/abab:118:1-3:177>.

УДК 636.294:637

И.Н. Гришаева, М.Г. Кротова

Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий
(Барнаул, Россия)

Способы переработки сырья маралов для получения биосубстанций функциональной направленности

Пантовый жмых и кости маралов являются новыми источниками сырья, которые можно использовать при производстве функциональных продуктов или для обогащения ежедневного рациона людей в качестве профилактики алиментарно-зависимых заболеваний. В ходе исследований апробирован способ вторичной переработки пантового жмыха, который включает ферментацию сырья с применением бактериальной протеазы на основе *bacillus subtilis*. Гидролиз осуществляли с использованием ультразвуковых волн в разных тем-

пературных режимах (t 45–50 °С; t 60–65 °С). В ходе работы получены две биосубстанции: твердая фракция пантового жмыха и жидкая фракция (супернатант). Твердая фракция характеризовалась высоким процентным содержанием кальция (192–194 г/кг) и фосфора (124–156 г/кг), а также микроэлементов – железа и цинка. Жидкая фракция гидролизата из пантового жмыха представлена низкомолекулярными соединениями в растворенной форме, которые легко усваиваются, проникают в клетку и включаются в процессы клеточного метаболизма. Такого рода продукт является диетическим и может быть применен в качестве композиционного компонента в составе продуктов функциональной направленности. Установлено, что оптимальным температурным режимом для перехода компонентов сырья в растворимую форму посредством ферментативной обработки является гидролиз при 60–65 °С в поле ультразвука, о чем свидетельствует меньшее содержание белка и жира в сухом остатке. В ходе исследований изучен биохимический состав нативного сырья из плоских и трубчатых костей маралов и пятнистых оленей с целью возможности применения их в пищевой промышленности. Установлено, что из 100 кг кости пантовых оленей можно получать до 32,0 кг белка и 19 кг жира. Самыми важными компонентами являются минеральные вещества, количество которых варьирует в пределах от 52 до 64%, а именно в 1 кг костной ткани содержится до 190 г кальция и 90 г фосфора, что обуславливает возможность применения данной биосубстанции для производства продуктов с высоким содержанием макроэлементов, при этом широкий комплекс других элементов является уникальным для восполнения дефицита этих веществ в организме человека.

Ключевые слова: технология производства, ферментация, гидролиз, гидролизат, ультразвук.

Введение. Создание функциональных продуктов диетического свойства и лечебно-профилактического действия является одной из задач, стоящих перед пищевой промышленностью, поскольку ухудшение здоровья населения России на 75–85 % обусловлено неправильным питанием. Все это требует неотложных мер по увеличе-

нию производства продуктов массового потребления с повышенной биологической ценностью, обогащенных витаминами, пищевыми волокнами, микроэлементами (Кильмаев, 2007).

Пантовое оленеводство – это отрасль животноводства, специализирующаяся на разведении маралов и пятнистых оленей, которая на современном этапе развития РФ может войти в десятку лидирующих отраслей, позволяющих обеспечить население страны экологически здоровыми продуктами питания.

Одним из интенсивно развивающихся и перспективных направлений мараловодства является разработка новых рецептур и технологий с использованием глубокой переработки сырья, что может способствовать повышению эффективности использования макро-, микроэлементов, белоксодержащего сырья, расширению ассортимента продуктов питания и решению экологических задач.

На основании вышеизложенного была поставлена цель изучить способы извлечения питательных биологически ценных веществ из сырья маралов с целью расширения ассортимента продукции функциональной направленности, содержащей уникальные естественные компоненты, способствующие омоложению, оздоровлению населения.

Материалы и методы исследования. Изучена возможность вторичной переработки пантового жмыха. Проведена повторная ферментация с применением бактериальной протеазы на основе *bacillus subtilis*. Гидролиз осуществляли в поле ультразвука в двух температурных режимах, в первом случае при t 45–50 °С, во втором при t 60–65 °С. Полученные гидролизаты из пантового жмыха разделили на фракции с применением центрифугирования.

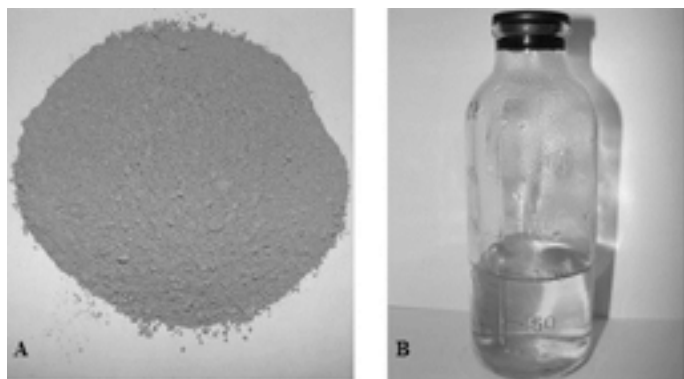
Для получения биосубстанции из кости пантовых оленей использованы плоские кости черепа, трубчатые кости конечностей маралов и пятнистых оленей. Сырье предварительно измельчали с применением костедробилки.

Отработан сухой способ – кондуктивный метод с применением инфракрасной сушки нативного сырья при t 45 °С в течение 16 часов с дальнейшим измельчением в порошок.

Оценку полученных образцов проводили по выходу биосубстанций, времени, затраченному на его изготовление и биохимическому составу.

Результаты исследования и их обсуждение. Для увеличения биодоступности компонентов из сырья маралов разработаны способы переработки, включающие физическую и ферментативную обработку, вызывающую распад гидролитических компонентов сырья, а также высокотемпературную экстракцию (Луницын, 2014, 2016; Гришавина, 2011). Проведены многочисленные исследования по переработке сырья с применением различных ферментов растительного, животного и микробного происхождения.

Разработанная технология переработки сырья позволила получить концентраты, растворимые в воде и органических растворителях, которыми можно обогащать продукты питания, придавая им заданные свойства.



*Фракции гидролизата из пантового жмыха:
А – твердая фракция, нерастворимая в воде;
В – жидкая фракция (супернатант)*

Наилучшие результаты по выходу концентрата, органолептическим свойствам и биохимическому составу получены с применением бактериальных и грибковых ферментов.

Установлено, что при первичной ферментации пантов марала даже при использовании самых современных ферментных препаратов в растворимую форму концентрата переходит до 65% от сухого вещества сырья, при этом 35% компонентов остается в виде жмыха. Согласно имеющимся исследованиям, по содержанию белка средняя проба жмыха из пантов содержит до 28% белковых составляющих

и до 1,3% жира. На основании полученных данных была изучена возможность вторичной переработки пантового жмыха. Гидролизаты, полученные из пантового жмыха, после повторной ферментации разделили на фракции, представленные на рисунке.

Согласно данным биохимического состава твердой фракции пантового жмыха (табл. 1) процесс перехода компонентов в растворимую форму интенсивнее проходил посредством ферментативной обработки в поле ультразвука при температуре гидролиза 60–65 °С, о чем свидетельствует меньшее содержание белка и жира в сухом остатке.

Таблица 1

Биохимический состав твердой фракции пантового жмыха
после вторичной обработки

Показатели	Гидролиз при t 45–50 °С	Гидролиз при t 60–65 °С
Вода, %	2,8	4,0
Белок, %	15,1	13,6
Жир, %	2,3	1,2
Зола, %	72,7	74,1
Минеральный состав		
Кальций, г/кг	194	192
Фосфор, г/кг	124	156
Хлор г/кг	28	28
Магний г/кг	11	16
Сера, г/кг	0,7	2,6
Железо мг/кг	14,6	5,8
Цинк, мг/кг	17,4	20,3

Минеральный состав сухого остатка представлен комплексом макро- и микроэлементов. Высокое процентное содержание кальция, фосфора, железа и цинка определяет возможность применения данной биосубстанции для обогащения продуктов питания человека.

Жидкая фракция гидролизата из пантового жмыха представлена низкомолекулярными соединениями в растворенной форме, которые легко усваиваются, проникают в клетку и включаются

в процессы клеточного метаболизма. Такого рода продукт является диетическим и может быть применен в качестве композиционного компонента в составе продуктов функциональной направленности.

Наряду с пантами от маралов получают мясо и побочную (второстепенную) продукцию – кровь, хвосты, жилы, репродуктивные органы, эмбрионы, которые используются в народной и традиционной медицине, а также косметологии. Помимо этого, третью часть туши маралов (21–27%) составляет костная ткань, которая на современном этапе практически не применяется в питании людей, несмотря на значительное содержание высокоусвояемого жира, белка и фосфорнокальциевых солей. В связи с этим полное использование костей пантовых оленей позволило бы не только значительно увеличить выход полезных веществ, но и создать новые биологически полноценные обогащенные продукты.

Использованием кости как пищевого продукта занимались ученые многих стран. Так, исследования советских ученых во главе с А.Б. Шарпенаком показали хорошую усвояемость костного препарата человеческим организмом. Кальций из этих препаратов усваивается аналогично кальцию молока (Какимов, 2006). А костный коллаген у животных представлен в основном первым типом, и на современном этапе он имеет широкое применение как ранозаживляющий компонент или носитель лекарственных средств. Костный коллаген обладает низкой иммуногенностью, участвует в процессе кальцификации органической матрицы (Накоскин, 2016). Так, например, в США и Великобритании пищевой костный продукт – «Lenphos» – применяется в качестве добавки к продуктам для детского и диетического питания, а также для обогащения соли, сахара, муки. В свою очередь, безотходная переработка кости может позволить перерабатывающим предприятиям сократить затраты труда и энергии, более эффективно использовать производственные площади.

Сотрудниками лаборатории технологии переработки и сертификации пантовой продукции Всероссийского научно-исследовательского института пантового оленеводства (ФГБНУ ФАНЦА) разработаны способы получения биосубстанций из кости пантовых оленей. При апробации способов применялись электрофизические

методы, которые позволили сохранить свойства нативного продукта. Извлечение из сырья всех ценных компонентов и дальнейшее их рациональное использование являются важным условием повышения эффективности производства и увеличения выработки продукции пантового оленеводства.

Разработанный способ переработки кости пантовых оленей позволяет получать до 40% выхода готового продукта в зависимости от технологии получения. Установлено, что нативный порошок из кости маралов и пятнистых оленей содержит большое количество питательных компонентов, представленные в таблице 2.

Таблица 2

Биохимический состав кости пантовых оленей

Показатель	Марал		Пятнистый олень	
	плоские кости	трубчатые кости	плоские кости	трубчатые кости
Белок	24,8±2,3	26,4±1,9	32,0±4,0	26,3±3,6
Жир	18,6±3,1	17,2±1,8	18,4±1,7	17,2±1,9
БЭВ	3,8±1,1	2,7±0,1	2,6±0,9	2,6±0,8
Вода	8,6±2,5	5,6±2,1	7,8±1,5	4,2±1,7
Зола	52,4±6,3	60,1±5,6	56,2±4,8	64,7±9,0
Минеральные вещества				
Кальций, г/кг	15,4±3,1	18,9±4,2	18,3±3,9	14,4±2,9
Фосфор, г/кг	7,1±1,9	8,7±3,0	8,9±2,5	7,6±2,1
Магний, г/кг	1,0±0,1	1,5±0,2	1,3±0,09	1,2±0,1
Сера, г/кг	2,1±0,2	2,9±0,3	3,4±0,2	3,1±0,3
Хлор, г/кг	2,6±0,3	1,2±0,24	1,0±0,1	2,4±0,2
Железо, мг/кг	5,3±0,4	7,2±1,5	6,3±3,4	5,1±1,9
Цинк, мг/кг	12,4±0,2	14,6±3,6	16,4±2,1	16,1±3,2

Анализируя биохимические показатели состава нативного сырья кости маралов и пятнистых оленей, мы можем заключить, что достоверной разницы по исследуемым показателям не установлено. При этом отмечается высокий уровень белка. Так, из 100 кг кости пантовых оленей можно получать до 32,0 кг белка и до 19 кг жира.

Самыми важными компонентами являются минеральные вещества, количество которых варьирует в пределах от 52 до 64%.

Прочность костной ткани людей напрямую зависит от содержания в костном матриксе макро- и микроэлементов. Так, суточная потребность трудоспособного человека по нормам ВОЗ в кальции составляет 1000 мг в сутки. В связи с этим в 100 г кости пантовых оленей содержится до 19 г кальция и 9,0 г фосфора, что вполне достаточно для производства продукта с высоким содержанием макроэлементов. При этом широкий комплекс других макро- и микроэлементов является уникальным для восполнения дефицита этих веществ в организме человека.

На данный момент один из способов переработки костей маралов проходит экспертизу в Федеральном институте промышленной собственности на выдачу патента Российской Федерации.

Выводы

1. Порошок твердой фракции пантового жмыха и биосубстанция из костей пантовых оленей, имеющий в своем составе большой комплекс минеральных и белковых веществ, можно применять для создания продуктов функциональной направленности, а также для профилактики алиментарных болезней.

2. Жидкая фракция гидролизата, содержащая низкомолекулярные соединения, может быть одним из важнейших компонентов в составе диетического питания.

Библиографический список

Гришаева И.Н., Луницын В.Г. Способ получения концентратов из побочной продукции пантового оленеводства // Проблемы пантового оленеводства и пути их решения: сб. науч. тр. / под ред. В.Г. Луницына. Барнаул, 2011. Т. 6. С. 171–177.

Какимов А.К., Тулеуов Е.Т., Кудеринова Н.А. Переработка мясокостного сырья на пищевые цели : монография. Семипалатинск, 2006. 130 с.

Кильмаев А.А., Разумовская Р.Г. Исследование ферментативного гидролиза малоценного рыбного сырья в технологии получения белковых продуктов // Вестник АГТУ. 2007. № 3. С. 120–123.

Луницын В.Г., Абашева О.В., Белозерских И.С., Неприятель А.А. Усо-

вершенствование способа переработки побочной продукции пантового оленеводства // Проблемы пантового оленеводства и пути их решения: сборник научных трудов. Барнаул, 2014. Т. 8. С. 81–84.

Луницын В.Г., Неприятель А.А. Безотходная технология переработки продукции пантового оленеводства // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2016. №5. С. 83–91.

Накоскин А.Н. Молекулярно-биологическое исследование внеклеточного матрикса костной ткани животных разных видов и влияние его отдельных ксенокомпонентов на остеогенез : дис. ... д-ра биол. наук. Челябинск, 2016. 265 с.

УДК 636.084:636.085.7

Р.В. Дорофеев, И.А. Функ, Т.Н. Орлова, К.Е. Шевченко, Е.Ф. Отт
Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий
(Барнаул, Россия)

Бактериальная закваска для силосования кормов

Приведён литературный обзор микробиологических процессов силосования кормов для сельскохозяйственных животных. В силосуемую массу попадают различные микроорганизмы: полезная (*Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*), технически-вредная и условно-патогенная микрофлора. Наибольший ущерб качеству силоса приносят маслянокислые бактерии (кlostридии). Ведущая роль в процессе силосования кормов принадлежит молочнокислым бактериям. Лактобактерии продуцируют молочную кислоту, которая подавляет размножение технически-вредной микрофлоры, а также они являются антагонистами по отношению к споровым микроорганизмам. Использование бактериальных заквасок при силосовании кормов позволяет изменить исходный состав естественной микрофлоры зелёной массы в пользу полезной микрофлоры и с самого начала направить микробиологический процесс в нужную сторону.

В Сибирском научно-исследовательском институте сыроделия разработана закваска прямого внесения для силосования кормов (ПЗСК). Закваска прямого внесения для силосования кормов создана на основе лактобацилл и пропионовокислых бактерий. Штаммы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, входящие в состав бактериальной закваски для силосования кормов, входят в состав Сибирской коллекции микроорганизмов (СКМ) лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдела «Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий». Молочнокислые бактерии обеспечивают необходимую интенсивность молочнокислого брожения, создают наиболее благоприятное соотношение органических кислот, снижают количество технически-вредной и условно-патогенной микрофлоры. Пропионовокислые бактерии обогащают силос витамином В₁₂, повышают аэробную стабильность и предотвращают порчу силоса после вскрытия силосохранилища. Использование закваски прямого внесения позволяет получить силос гарантированного качества. Применение закваски для силосования кормов ПЗСК улучшает качество молока по микробиологическим показателям и санитарно-экологическую обстановку в хозяйстве.

Ключевые слова: бактериальная закваска, закваска для силосования кормов, ПЗСК, молочнокислые бактерии, пропионовокислые бактерии, сельскохозяйственные животные.

Развитие промышленного животноводства невозможно без создания прочной кормовой базы. Одним из лучших способов заготовки кормов является приготовление сенажа или силоса (Левахин и др., 2012).

В основе силосования лежит сложный микробиологический процесс. Растительная масса, направляемая на силосование, содержит полезную микрофлору – молочнокислые лактобациллы (*Lactobacillus plantarum*), лактококки (*Lactococcus lactis*), технически-вредную и условно-патогенную микрофлору – сенная (*Bacillus subtilis*) и картофельная бациллы (*Bacillus mesentericus*), масляно-

кислые бактерии (*Clostridium tyrobutyricum* и др.), бактерии группы кишечных палочек (БГКП), микрококки, актиномицеты, плесени, дрожжи, псевдомонады (*Pseudomonas aeruginosa*) и др.). Их численность и состав меняются в зависимости от вида растений, агротехнических мероприятий, климатических и погодных условий. Вредная микрофлора, входящая в состав силосной массы, может интенсивно размножаться и вызывать интенсивные гнилостные и бродильные процессы, приводящие к порче и разложению корма (Квасников, 1975).

Наибольший ущерб качеству силоса приносят маслянокислые бактерии (кlostридии). Они поступают в силосуемую массу с поверхности земли, растений, а также при утрамбовке в силосных траншеях с поверхности трактора. Особенно много маслянокислых бактерий в силосе плохого качества – их интенсивное размножение в силосе и является главной причиной снижения качества корма. Для характеристики силоса используют отношение масляной и молочной кислот. Если это отношение больше или равно 0,5, то силос называют «кlostридиальным». «Кlostридиальный» силос содержит большое количество спор маслянокислых бактерий, а молоко, полученное от коров, которым дают некачественный силос, как правило, непригодно для выработки сыров, чувствительных к маслянокислому брожению (Гудков, 2004).

На рисунке 1 показан сыр, выработанный из молока, в котором содержалось повышенное количество спор маслянокислых бактерий (наиболее вероятное число спор – 1000 в 1 см³ молока). По органолептическим показателям сыр характеризовался сильным привкусом масляной кислоты, рисунок не соответствовал данному виду сыра. Данный сыр был переведён в технический брак.

На рисунке 2 показан сыр, выработанный из молока, в котором отсутствовали маслянокислые бактерии. По органолептическим показателям сыр получил высокую балльную оценку. Необходимо отметить, что на выработку сыров с низкой температурой второго нагревания молоко должно содержать наиболее вероятное число спор не более 13 в см³ молока, а при выработке сыров с высокой температурой второго нагревания (Советский, Алтайский и др.) – не более 2,5 споры/см³ (МР 2.3.2.2327-08, 2008).



Рис. 1. Сыр с высокой температурой второго нагревания, выработанный из молока с повышенным содержанием спор маслянокислых бактерий



Рис. 2. Сыр с высокой температурой второго нагревания, выработанный из молока, не содержащего спор маслянокислых бактерий

Ведущая роль в процессе силосования кормов принадлежит молочнокислым бактериям. Лактобактерии продуцируют молочную кислоту, которая угнетает размножение технически-вредной ми-

крофлоры, кроме того, они обладают специфическим антагонизмом к маслянокислым бактериям. В результате брожения силосной массы концентрация молочной кислоты достигает 60% и более, активная кислотность силосной массы снижается до 4,2–4,5 ед. рН. Кроме молочной кислоты в силосе накапливаются уксусная и масляная кислоты. Концентрация уксусной кислоты не должна превышать 40–60% всех органических кислот, масляной кислоты должно быть не более 0,2% (ГОСТ Р 55986, 2014; Квасников и др., 1975; Rust et al., 1989; Капустин и др., 2003, Гибадуллина и др., 2015).

Таким образом, благоприятный исход силосования зависит в первую очередь от успешного развития молочнокислых бактерий.

Если значение рН силоса по тем или иным причинам выше 4,5–4,7, то создаются условия для развития технически-вредной микрофлоры (бактерии группы кишечных палочек, дрожжи и плесени, маслянокислые бактерии), которые будут ухудшать качество силоса при его хранении.

В случае размножения технически вредной микрофлоры в силосуемой массе возрастают потери питательных веществ, снижается поедаемость корма, увеличивается содержание микотоксинов. При закладке силоса необходимо принять все меры, чтобы силосуемая масса была хорошо утрамбована, надёжно укрыта для того, чтобы при хранении не заплесневела, не прогоркла и не переокисла.

Чтобы получить хороший силос, используют бактериальные закваски, содержащие полезную микрофлору (молчнокислые лактобациллы, пропионовокислые бактерии). Вышеперечисленная микрофлора будет способствовать получению высококачественного силоса (Копылова и др., 2016).

Применение бактериальных заквасок позволяет изменить исходный состав естественной микрофлоры зелёной массы в пользу полезной микрофлоры и, таким образом, с самого начала направить микробиологический процесс в нужную сторону, что свидетельствует об актуальности работ по разработке биоконсервантов.

Многолетний опыт, полученный при заготовках силоса в различных климатических районах мира, показал, что применение бактериальных заквасок:

- 1) сокращает продолжительность ранней стадии процесса силосования, подавляет развитие нежелательной микрофлоры, способствует интенсивному и устойчивому протеканию молочнокислого брожения;
- 2) повышает питательную ценность силоса на 10–18%, что соответствует повышению выхода готового силоса с каждой тонны на 100–180 кг.
- 3) скармливание силоса, приготовленного с использованием заквасок, увеличивает на 15–20% среднесуточные привесы откормочных бычков и на 5–6% удои лактирующих коров (Шинкаревич, 2015; Икоева и др., 2016; Буряков и др., 2018).

Особенно эффективно применение заквасок при заготовке силоса из трудносилосуемых растений, а также соломы и грубостебельчатых остатков растениеводства.

Вместе с тем необходимо иметь в виду, что применение заквасок не даст ожидаемого эффекта, если будет нарушена технология силосования, из-за чего в силосуемой массе создадутся условия, неблагоприятные для размножения полезных заквасочных микроорганизмов.

В лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдела сыроделия Федерального Алтайского научного центра агробiotехнологий разработана бактериальная закваска прямого внесения для силосования кормов (ПЗСК).

ПЗСК содержит смесь специально подобранных штаммов молочнокислых и пропионовокислых бактерий. Штаммы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, входящие в состав бактериальной закваски для силосования кормов, входят в состав Сибирской коллекции микроорганизмов (СКМ) лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов Сибирского НИИ сыроделия. Микрофлора ПЗСК в процессе своей жизнедеятельности энергично продуцирует молочную, уксусную и пропионовую кислоты, обладает высокой антагонистической активностью к микробам, вызывающих порчу силоса (гнилостные, маслянокислые бактерии, бактерии группы кишечных палочек и др.). В состав препарата ПЗСК входят так называемые осмоотолерантные штаммы молочнокислых лактобацилл, способные активно функционировать при низком содержании влаги

в субстрате; это делает препарат незаменимым при обработке сенажа или подвяленных трав.

Пропионовокислые бактерии, входящие в состав ПЗСК, обогащают силос витаминами группы В, в том числе противоанемическим витамином В12, который известен также как фактор, способствующий усвоению растительных белков (Воробьёва, 1995). ПЗСК приобретает пробиотические свойства, улучшается сыропригодность молока. Кроме того, пропионовокислые бактерии придают сенажу и силосу устойчивость к так называемой аэробной порче – быстрому снижению качества корма при вскрытии силосохранилища (Bolsen et al., 1996).

Микрофлора, входящая в состав ПЗСК, находится в количестве, обеспечивающем протекание микробиологического процесса при силосовании кормов. По сравнению с химическими консервантами ПЗСК дешевле, удобнее в применении и полностью безопасна для здоровья персонала и животных, не загрязняет окружающую среду, не вызывает коррозии оборудования, у неё нет проблемы передозировки.

ПЗСК предназначена как для обработки высокосахаристых растений (кукуруза, подсолнечник, сорго), так и трудносилосующихся растений (клевер, эспарцет, люцерна, бобовые, злаковые травосмеси, разнотравье), а также соломы и грубостебельчатых остатков растениеводства.

ПЗСК успешно применяется при заготовке кормов в хозяйствах Алтайского края, в засушливые и в дождливые годы, при закладке сенажа и силоса, при обработке подвяленных трав он зарекомендовал себя как эффективный биоконсервант.

Выводы:

1. Использование закваски для силосования кормов ПЗСК позволяет получить высококачественный силос.
2. Применение закваски для силосования кормов ПЗСК улучшает качество молока по микробиологическим показателям и санитарно-экологическую обстановку в хозяйстве.

Библиографический список

Буряков Н.П., Миронов М.М. Эффективность использования силоса, приготовленного с использованием биоконсерванта // Кормление

сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. М., 2018. С. 38–53.

Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии. М., 1995. 235 с.

Гибадуллина Ф.С., Фаттахова З.Ф. Консервирование люцерны с использованием биологического консерванта // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29, №5. С. 72–74.

ГОСТ Р 55986-2014: Силос из кормовых растений. Общие технические условия. М., 2014. 10 с.

Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / под ред. С.А. Гудкова. 2-е изд., испр. и доп. М., 2003. 800 с.

Икоева Л.П., Хаева О.Э. Влияние консервированного силоса из люцерны с биопрепаратом «Лидер» на продуктивные качества коров // Известия Горского гос. аграрного университета. 2016. С. 84–88.

Капустин Н.К., Саханчук А.И., Ходаренок Е.П. Качество силосов, заготовленных с биоконсервантами // Зоотехническая наука Беларуси. Т. 38. 2003. С. 193–199.

Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М., 1975. 392 с.

Копылова Е., Вербицкий С., Даниленко С. Биоконсерванты для силоса // Животноводство России. 2016. №7. С. 59–60.

Левахин В.И., Поберухин М.М., Сиразетдинов Р.Ф., Бабичева И.А. Влияние силоса, заготовленного с биоконсервантами, на переваримость питательных веществ рационов и обмен энергии в организме животных // Известия Оренбургского ГАУ. 2012. Т. 33, № 1-1. С. 243–245.

МР 2.3.2.2327-08 Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов). Углич, 2008. 243 с.

Шинкаревич Е.Д. Эффективность применения биологического консерванта «Лактофлор-фермент» при силосовании травянистых кормов // Известия Санкт-Петербургского гос. аграрного университета. 2015. С. 58–60.

Benfeldt C., Morgenstern H.U. Strains of Propionibacterium // US Patent Application 2015/0150298. 2015.

Bolsen K.K., Bonilla D.R., Huck G.L., Young M.A., Hart-Thakur R.A. Effect of a propionic acid bacterial inoculant on fermentation and aerobic stability of whole-plant corn silage // Journal of Animal Science. 1996. Vol. 74. P. 274.
Rust S.R. et al. Effect of microbial inoculant on fermentation characteristics and nutritional value of corn silage // J. Product. Agr. 1989. №2. P. 235–241.

УДК 637.325:543.54

В.В. Ельчанинов, А.Н. Белов, А.Д. Коваль

*Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий
(Барнаул, Россия)*

Выделение молокосвертывающих ферментов из утилизируемых технологических жидкостей методом хроматографии на Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high substitution)

Исследована возможность выделения сычужного фермента, говяжьего пепсина и молокосвертывающего фермента из сычугов северного оленя из технологических жидкостей с высокой ионной силой методом хроматографии на Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high substitution). Использование сорбента на основе 6% агарозы позволяет повысить скорость фракционирования и более чем вдвое сократить время хроматографического процесса. Увеличение скорости хроматографического процесса не влияет на механическую стабильность сорбента и эффективность выделения молокосвертывающих ферментов. Метод гидрофобной хроматографии может быть использован для повышения эффективности производства за счет дополнительного получения натуральных молокосвертывающих ферментов из утилизируемых отходов производства.

Ключевые слова: хроматография, молокосвертывающие ферменты, сычужный фермент, говяжий пепсин.

Введение. В основе сыроделия лежит коагуляция молока под действием молокосвертывающих ферментов (МФ). Сырьем для получения натуральных МФ служат желудки сельскохозяйственных животных (Harboe et al., 2010; Jacob, 2011). Процесс производства МФ включает несколько основных стадий: 1) водно-солевыми растворами из измельченного сырья экстрагируют профермент (зимоген); 2) зимоген активируют и получают разбавленный раствор активного фермента; 3) активный МФ высаливают; 4) осадок МФ отделяют, высушивают и формулируют. Основными отходами производства являются технологические жидкости (супернатанты), остающиеся после стадии высаливания и удаления осадков МФ (Теплы и др., 1980).

При высаливании белки никогда не осаждаются полностью (Скоупс, 1985), супернатанты всегда содержат некоторые количества МФ, выделению которых препятствуют высокая ионная сила и вязкость (Теплы и др., 1980). Поэтому технологические жидкости не подлежат вторичной переработке и утилизируются вместе с остающимися в них МФ. Объемы утилизируемых жидкостей на крупных предприятиях могут достигать 200–400 х 10³ литров в год.

В то же время известно, что именно высокая стартовая концентрация соли является необходимым условием сорбции белков на гидрофобных хроматографических сорбентах (Hydrophobic Interaction..., 2002).

Ранее нами разработана технология выделения молокосвертывающих ферментов из растворов с высокой ионной силой методом гидрофобной хроматографии (ГФХ) (Ельчанинов и др., 2005; Патент на полезную..., 2005; Ельчанинов, 2006). Лимитирующими факторами данной технологии являются низкая скорость хроматографического процесса, обусловленная вязкостью супернатантов и пределом механической прочности гранул использованного сорбента – Phenyl Sepharose CL-4B. Применение сорбентов с повышенной прочностью гранул агарозы должно повысить эффективность хроматографического процесса.

Цель данной работы – исследование параметров выделения из утилизируемых технологических жидкостей различных МФ методом хроматографии на Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high substitution).

Материалы и методы исследования. Препараты сычужного фермента (СФ) и говяжьего пепсина (ГП) получали методом высаливания хлоридом натрия, в соответствии с технологическими инструкциями ОАО «Московский завод сычужного фермента». МФ северного оленя (МФСО) получали методом высаливания сульфатом аммония (Ельчанинов, 2005).

Для выделения МФ из супернатантов использовали сорбент для ГФХ, производства «GE Healthcare» (Швеция): Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (hig sub). Сорбент имеет следующие основные характеристики: средний размер частиц – 90 μm , диапазон pH стабильности 3–13, концентрация лиганда – 40 $\mu\text{mol/ml}$ геля, рекомендуемые скорости потока – 200–400 см/час, максимальное рабочее давление – 1 bar.

Подготовка образца СФ: к 500 мл супернатанта, получаемого в результате процедуры высаливания и удаления осадка фермента (концентрация NaCl – 3,4М, pH=1,8), добавляли 1,0 М раствор NaOH до pH 5,6. Полученный образец обозначали как «Супернатант СФ».

Подготовка образца ГП: к 500 мл супернатанта, остающегося после процедуры высаливания и удаления осадка говяжьего пепсина (концентрация NaCl – 3,2 М, pH=1,5), добавляли 1,0М раствор NaOH до pH 5,0. Полученный образец обозначали как «Супернатант ГП».

Подготовка образца МФСО: к 500 мл супернатанта после осаждения молокосвертывающего фермента сульфатом аммония (концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,6М, pH= 3,0), добавляли 1,0М раствор NaOH до pH 5,6. Полученный образец обозначали как «Супернатант МФСО».

Фракционирование. Колонку HiTrap (1,6 x 2,5 см), заполненную 5 мл Phenyl Sepharose Fast Flow (high sub), уравнивали 30 мл 50 мМ Na-Фосфатного буфера (pH=5,6) с добавлением 1,0 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (для МФСО) или 2,0М NaCl (для СФ и ГП). Скорость фракционирования на всех стадиях составляла 250 мл/час (125 см/час). Образец наносили в объеме 500 мл. Элюируемую фракцию «проскока» собирали, определяли оптическую плотность при 280 нм (A_{280}) и молокосвертывающую активность (МА). Промывали колонку 50 мл 2,0 М раствора натрия хлорида (для СФ и ГП) или 1,0М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (для МФСО).

Элюируемую фракцию (промежуточная фракция) собирали, определяли A_{280} и МА. Связавшийся с гидрофобным сорбентом МФ десорбировали, промывая колонку 20 мл дистиллированной воды. В элюате (финальная фракция) определяли МА и A_{280} . Все хроматографические операции проводили при комнатной температуре.

Регенерацию и хранение гидрофобного сорбента осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями фирмы «Amersham Biosciences» (Hydrophobic Interaction..., 2002), МА определяли по ОСТ 10 288-2001 и выражали в условных единицах на миллилитр (УЕ/мл). Суммарный выход МА рассчитывали, умножая значение МА на объем фракции.

Результаты и обсуждение. Метод ГФХ был использован Heinson и Murphy (United States Patent..., 1993) для выделения и очистки рекомбинантного химозина, продуцируемого грибом *Aspergillus niger*. Рекомбинантный химозин сорбировали на Phenyl Sepharose CL-4B с последующей десорбцией водой или фосфатным буфером. Наносимый на колонку раствор фермента подкисляли до pH 2,0. Вызывает сомнение целесообразность использования таких кислых растворов, так как рабочий диапазон pH для всех видов гидрофобизированных производных агарозы составляет 3–13. При pH < 3, стабильность хроматографического носителя снижается, что приводит к потере адсорбционной емкости (Hydrophobic Interaction ...2002).

Для исследованных образцов МФ мы использовали диапазон pH, равный 5,0–5,6, что обусловлено двумя факторами: 1) при этих значениях исследованные МФ стабильны; 2) по данным Hjerten (1986), времена удерживания большинства белков на гидрофобных лигандах незначительно меняются в диапазоне pH 5,0–8,5.

Из данных, представленных в таблицах 1–3, следует, что при выбранных значениях pH, содержащиеся в исходных образцах МФ, эффективно сорбируются на Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) – фракции «проскока» и промежуточные фракции не проявляют МА. При pH 5,0 и 5,6 и концентрации сульфата аммония и хлорида натрия 1,0М и 2,0М соответственно, основная часть гидрофильных балластных белков не связывается с гидрофобными лигандами сорбента и удаляются при нанесении образца и промывке. Выход коагуляци-

онно неактивных белков, рассчитанный по объему и A_{280} фракций «проскока» и промежуточных фракций, составляет для МФСО, СФ и ГП, соответственно, 97,4, 91,7 и 88,4% от A_{280} , наносимого на колонку образца. Все исследованные МФ элюируются с гидрофобных сорбентов дистиллированной водой – МА регистрируется только в финальных фракциях.

Степени очистки финальных фракций, рассчитанные по A_{280} , составляют для МФСО, СФ и ГП 16,2, 11,0 и 13,5 соответственно. Эти цифры следует считать приближенными, так как финальные фракции, вероятно, контаминированы балластными белками, имеющими близкие с ними гидрофобные свойства. Косвенно это подтверждается и тем, что при очистке МФСО методом ионообменной хроматографии был получен препарат с удельной МА примерно $2100 \text{ УЕ}/A_{280}$ (Ельчанинов, 2005), тогда как удельная МА МФСО, выделенного из технологической жидкости методом ГФХ, оказалась почти в 4 раза ниже и составила $500 \text{ УЕ}/A_{280}$. Загрязнение финальных фракций коагуляционно неактивными протеинами может быть обусловлено низкой хроматографической селективностью метода ГФХ в отношении компонентов белковой смеси, имеющих близкие гидрофобные характеристики (Скоупс, 1985).

Таблица 1

Основные характеристики хроматографических фракций, полученных при фракционировании «Супернатанта МФСО» на Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)

Название фракции	Объем фракции (мл)	A_{280}	МА (УЕ/мл)	Суммарный выход МА (УЕ)
Образец, перед нанесением на колонку Phenyl Sepharose CL-4B	500	6,33	н.о.*	н.о.
Фракция «проскока»	500	5,98	н.о.	н.о.
Промежуточная фракция	50	1,85	н.о.	н.о.
Финальная фракция	20	0,39	480	9600

* – не определяется.

Таблица 2

Основные характеристики хроматографических фракций,
полученных при фракционировании «Супернатанта СФ»
на Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)

Название фракции	Объем фракции (мл)	A ₂₈₀	МА (УЕ/мл)	Суммарный выход МА (УЕ)
Образец, перед нанесением на колонку Octyl Sepharose CL-4B	500	9,01	н.о.*	н.о.
Фракция «проскока»	500	8,04	н.о.	н.о.
Промежуточная фракция	50	2,18	н.о.	н.о.
Финальная фракция	20	0,82	1175	23500

* – не определяется

Таблица 3

Основные характеристики хроматографических фракций,
полученных при фракционировании «Супернатанта ГП»
на Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)

Название фракции	Объем фракции (мл)	A ₂₈₀	МА (УЕ/мл)	Суммарный выход МА (УЕ)
Образец, перед нанесением на колонку Butyl Sepharose 4FF	500	12,64	н.о.*	н.о.
Фракция «проскока»	500	11,19	н.о.	н.о.
Промежуточная фракция	50	3,01	н.о.	н.о.
Финальная фракция	20	0,94	1280	25600

* – не определяется

Таким образом, контаминированность балластными белками МФ, полученных методом ГФХ из технологических жидкостей, является своеобразной «платой» за возможность получения дополнительных количеств МФ из утилизируемых отходов производства. Наблюдаемые различия в выходе МФ можно объяснить индивидуальными

сорбционными свойствами ферментов или отражением эффективности используемых технологий экстракции и высаливания.

По сравнению с использованным ранее сорбентом (Phenyl Sepharose CL-4B) концентрация агарозы в матрице Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (h.s.) увеличена в 1,5 раза, до 6%. Как следствие, при прочих равных характеристиках (размер гранул, pH-стабильность, концентрация лиганда) максимальная скорость потока для Phenyl Sepharose 6 Fast Flow возрастает в 2,5 раза и может достигать 400 см/час (Hydrophobic Interaction ..., 2002). При использовании Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (h.s.) для фракционирования утилизируемых жидкостей скорость процесса была увеличена в 2,2 раза по сравнению с Phenyl Sepharose CL-4B, что не повлияло на стабильность хроматографической матрицы и эффективность выделения МФ (табл. 4).

Таблица 4

Скорость хроматографического процесса и выходы МА
при фракционировании технологических жидкостей
на различных гидрофобных сорбентах

Сорбент	Скорость (см/час)	Выход МА (УЕ/л супернатанта)		
		МФСО	СФ	ГП
Phenyl Sepharose CL-4B*	56	15000	48000	52000
Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)	125	19200	47000	51200

* – данные взяты из работы [7].

Расчеты показывают, что переработка с использованием метода ГФХ, 200 x 103 литров утилизируемых технологических жидкостей, остающихся от производства СФ или ГП, позволила бы получить дополнительно около 94 кг или 102 кг стандартных МФП для сыр-деля с активностью 100000 УЕ. При розничной цене за 1 кг СФ или ГП, равной 4602 и 3186 руб. соответственно (по данным на январь 2018 г.), выручка от реализации дополнительных количеств этих МФ составила бы 432588 и 324972 руб. Расчеты для МФСО не приводятся, так как данный фермент серийно не выпускается.

Таким образом, показана возможность двукратного увеличения скорости выделения остающихся в утилизируемых технологических

жидкостях МФ методом ГФХ с использованием Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high substitution). Увеличение скорости хроматографического процесса не влияет на механическую стабильность сорбента и эффективность сорбции и десорбции молокосвертывающих ферментов.

Библиографический список

Ельчанинов В.В. Молокосвертывающий фермент из сычугов северного оленя. 4: Выделение из утилизируемых жидкостей методом гидрофобной хроматографии // Сыроделие и маслоделие. 2006. № 2. С. 33–34.

Ельчанинов В.В. Молокосвертывающий фермент из сычугов северного оленя. 2: Частичная очистка методом ионообменной хроматографии // Сыроделие и маслоделие. 2005. №6. С. 26–28.

Ельчанинов В.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Уманский М.С. Выделение молокосвертывающих ферментов из утилизируемых технологических жидкостей методом гидрофобной хроматографии // Современные проблемы техники и технологии переработки молока : сборник научных трудов с международным участием. Барнаул, 2005. С.122–129.

Ельчанинов В.В., Уманский М.С., Белов А.Н., Коваль А.Д., Шелепов В.Г. Молокосвертывающий фермент из сычугов северного оленя. 1: Выделение и краткая характеристика // Сыроделие и маслоделие. 2005. №4. С.13–16.

Патент на полезную модель № 48710. Российская Федерация, МПК7 A23 C 19/032. Линия производства молокосвёртывающего ферментного препарата / Ельчанинов В.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Уманский М.С.; авторы являются заявителями и патентообладателями. – № 2005109079/22; заявл. 29.03.2005., опубл.10.11.2005, Бюл. № 31. 2 с.

Скоупс Р. Методы очистки белков. М., 1985. С. 56–102.

Теплы М., Машек Я., Гавлова Я. Молокосвертывающие ферменты животного и микробного происхождения. М., 1980. С. 82–158.

Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. In: Technology of Cheesemaking. Law BA, Tamime AY, Eds., John Wiley & Sons., Ch. 3. The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants, 2010. P. 98-129. DOI: 10.1002/9781444323740.ch3.

Hjerten S., Yao K., Erkssohn K.O., Johansson B. Gradient and isocratic High Performance Hydrophobic Interaction Chromatography of proteins on agarose columns // J. Chromatography. 1986. N 359. P. 99–109.

Hydrophobic Interaction Chromatography. Principles and Methods / Edition: Amersham Biosciences, 2002. P. 21–79.

Jacob M., Jaros D., Rhom H. Recent advances in milk clotting enzymes // International Journal of Dairy Technology. 2011. Vol. 64, N 1. P. 14–33. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x.

United States Patent, International Class: C12N 009/64. Process for recovery and purification of chymosin / Heinson H.G., Murphy M.B.; Assignee: Genencor International, Inc. № 5,215,908; Filed 16.04.92; 01.06.1993.

УДК 664.69

О.М. Завалишина

*Алтайский государственный аграрный университет (Барнаул,
Россия)*

Производство макаронных изделий с использованием различных видов муки

Проведена сравнительная оценка макаронных изделий групп А и В, произведенных из макаронной крупки твердых сортов пшеницы, хлебопекарной высшего сорта, а также с добавлением к ней 10 % гречневой и соевой муки. В качестве критериев оценки взяты органолептические, физико-химические показатели качества продукции и ее потребительские характеристики.

Ключевые слова: мука пшеничная, мука соевая, мука гречневая, макаронные изделия, показатели качества.

Концепцией государственной политики РФ в области здорового питания людей на период до 2020 г. является создание функциональных продуктов, которые должны удовлетворять физиологические потребности организма человека в необходимых питательных веществах и энергии. В питании больных целиакией детей и взрослых специалистами предлагается использование специализированных безглютеновых продуктов, изготовленных из такого сырья, как гречневая, рисовая и кукурузная мука, кукурузный крахмал. Применение этих составляющих возможно для имитации традиционных продуктов: хлеба, печенья, макаронных изделий. Согласно Codex Alimentarius ФАО/ВОЗ, содержание глютена в таких продуктах не должно превышать 20 мг/кг.

Макаронные изделия относятся к наиболее распространенным пищевым продуктам, спрос на которые многие десятилетия остается стабильным. Роль макаронных изделий в рационе питания – причем практически во всем мире – трудно переоценить. Многие статистики считают их основным продуктом питания XX–XXI столетий (Гордина, 2012). Ежегодно рост их потребления повышается на 5%, а производство – на 10% (Осипова, 2010). При этом расширяется и ассортимент изделий, различающихся между собой размерами, формой и присутствием в рецептуре различного рода добавок, влияющих на биологическую ценность и вкусовые показатели. В России потребление макаронных изделий в среднем составляет на одного человека 7 кг/год.

По данным Союза мукомолов, в России ежегодно производится более 950 тыс. т макаронных изделий. Из этого объема из макаронной муки, выработанной из твердой пшеницы, получают лишь 10% изделий. Макароны из такой муки считаются более качественными: они сохраняют форму при приготовлении, содержат больше полезных микроэлементов и не способствуют полноте. Тем не менее спрос на муку из твердых сортов из-за ее высокой себестоимости пока низок: твердая пшеница дороже мягкой в среднем на 20, 25%. В результате нет роста производства зерна твердой пшеницы, а мощности мельниц макаронного помола загружены только на 40%. В этой связи сырьем для производства макаронных изделий в нашей стране служит в основном макаронная крупка, получаемая из мягких высоко-стекловидных сортов пшеницы.

Основным недостатком макаронных изделий из мягких сортов пшеницы является их низкая пищевая ценность, а также высокая калорийность. Макароны из мягких сортов пшеницы содержат 11–12% белковых веществ, 70–72% углеводов (в основном крахмала), 13% влаги и 0,5–0,7% жира, содержание минеральных веществ и клетчатки очень незначительно. Поэтому при выработке макаронных изделий целесообразно применять различные обогатители для улучшения их биологической и пищевой ценности (Малютина, 2014).

В последние годы все большее распространение получают витаминизированные макаронные изделия, но актуальным, несомненно, является разработка технологий производства с использованием нетрадиционного сырья и добавок, с помощью которых можно повысить содержание в продукте витаминов, макро- и микроэлементов и других биологически ценных веществ и в то же время обеспечить стабильность качества продукции. Ведущие производители макаронных изделий Алтайского края, например ОАО «Алтайские макароны», выпускают изделия с добавлением к основному виду сырья 10% гречневой и соевой муки.

Полезные свойства обогащенного соевой мукой продукта обуславливает ее химический состав. В состав соевой муки входят кальций, калий, натрий, магний, фосфор, железо, витамины PP, A, E, бета-каротин, группы B (тиамин и рибофлавин). В сравнении с пшеничной соевая мука обладает более низкой калорийностью – 291 кал/100 г. По содержанию белка и незаменимых аминокислот соя не равна в числе зерновых, масличных и других зернобобовых; белки сои представлены в основном альбуминами и глобулинами (68,4–78,7%). Липиды сои на 95–97% состоят из триглицеридов, в небольших количествах представлены биологически активные вещества: фосфолипиды (1,5–2,5%), неомыляемые вещества (1,6%), стеролы (0,33%), токоферолы (0,15–0,21%), свободные жирные кислоты (0,3–0,7%). Триглицериды соевого масла имеют благоприятное соотношение кислот омега-6 и омега-3 (Субботина, 2017).

Гречневая мука – не менее ценный в отношении содержания полезных для человека веществ. Она характеризуется высокой степенью сбалансированности по наличию в ней незаменимых аминокислот: лейцина, валина, метионина, фенилаланина, лизина. Содер-

жание в муке из гречихи витаминов В1, В2 и РР в среднем в 4 раза превышает их содержание в пшеничной муке высшего сорта. В ней содержатся такие микроэлементы, как железо, марганец, фосфор, магний, калий, молибден, кобальт.

Целью наших исследований явилось проведение сравнительной оценки качества макаронных изделий, выпускаемых ОАО «Алтайские макароны» под различными торговыми марками (ТМ): спиралька, ТМ «Pasta Veneta», группа А, высший сорт; спиралька, ТМ «Алмак», группа В, высший сорт; спиралька, ТМ «Продукт для здоровья», группа В, с добавлением гречневой муки, высший сорт; спиралька, ТМ «Продукт для здоровья», группа В, с добавлением соевой муки, высший сорт. В качестве критериев оценки взяты органолептические и физико-химические показатели качества продукции, а также её потребительские характеристики. Анализируемые образцы изделий были произведены по традиционной технологической схеме, включающей следующие операции: подготовка сырья, приготовление теста, прессование (формование) теста (экструзия), разделка сырых изделий (обдувка, резка, раскладка), сушка изделий, охлаждение высушенных изделий, сортировка и отбраковка готовых изделий, упаковка.

По результатам экспертизы установлено, что цвет всех образцов изделий соответствует типу сырья: янтарно-желтый для макарон группы А, кремовый, однородный – группы В, светло-коричневый – с добавлением гречневой муки, светло-желтый – с добавлением соевой муки. Следов непомеси у изделий не наблюдалось. Макароны характеризовались гладкой поверхностью, стекловидным изломом. Вкус и цвет соответствовали типу изделий.

Согласно требованиям, предъявляемым к качеству макаронных изделий нормативной документацией, влажность продукта не должна превышать 13 %. Анализируемые образцы по данному показателю качества соответствовали установленным нормам. При этом влажность изделий варьировала от 11,7 до 12,1 в зависимости от вида макарон (табл. 1).

Согласно требованиям, установленным ГОСТами, кислотность традиционных изделий и изделий с обогащающими добавками не должна превышать 4 оН. По результатам исследования выявлено, что наибольшая кислотность отмечена у изделий с добавлением

гречневой и соевой муки – 3,5 и 3,2 оН соответственно, а наименьшая – у изделий группы А – 2,9 оН.

Таблица 1

Физико-химические показатели качества макаронных изделий

Образец	Влажность, %	Кислотность, °Н	Содержание крошки, %	Содержание деформированных изделий, %
Макаронные изделия, группа А, высший сорт	12,1	2,9	0	0
Макаронные изделия, группа В, высший сорт	11,8	3,0	0,5	1,1
Макаронные изделия, группа В, с добавлением гречневой муки, высший сорт	12,0	3,5	1,8	4,2
Макаронные изделия, группа В, с добавлением соевой муки, высший сорт	11,7	3,2	2,2	3,6

Крошка и деформированные изделия ухудшают внешний вид и снижают потребительские качества макаронной продукции. Деформированными считаются фигурные изделия с отклонениями от заданной формы: имеющие не свойственную своему наименованию форму, смятые полностью или частично.

Крошкой считают обломки, обрывки и обрезки макаронных изделий независимо от их размеров.

В результате проведенной оценки было установлено, что в макаронах группы А деформированных изделий обнаружено не было, а в изделиях с добавлением нетрадиционного сырья наблюдалось 4,2% у макаронных изделий с гречневой мукой и 3,6% у изделий с соевой мукой. При этом у всех образцов данный показатель значительно ниже допустимой стандартами нормы (5% для фасованных и 7% для весовых изделий).

Образец изделия группы А не содержал крошки, в то время как изделия, произведенные с добавлением гречневой и соевой муки, характеризовались ее наличием (1,8 и 2,2% соответственно).

Такая разница в показателях объясняется тем, что гречневая и соевая мука относятся к БКС, следовательно, их добавление к пшеничной муке отрицательно сказывается на пластичности и плотности теста и готовых изделий.

Варочные свойства макаронных изделий характеризуются длительностью варки до готовности, количеством поглощенной воды, потерей сухих веществ, прочностью сваренных изделий, степенью слипаемости.

Длительность варки до готовности определяют по промежутку времени от помещения изделий в кипящую воду до момента исчезновения мучнистого, непроварившегося слоя. Наиболее длительным промежутком времени до готовности отличались образцы макаронных изделий группы А (табл. 2), что связано с наличием в их составе крепкой по качеству клейковины. Макароны этой группы характеризовались наименьшим коэффициентом увеличения массы изделий, что также обусловлено особенностями клейковинных белков.

Таблица 2

Варочные свойства макаронных изделий

Образец	Длительность варки до готовности, мин	Коэффициент увеличения массы изделий	Содержание сухого вещества, перешедшего в варочную воду, %
Макаронные изделия, группа А, высший сорт	7	1,6	4,1
Макаронные изделия, группа В, высший сорт	6	2,0	5,2
Макаронные изделия, группа В, с добавлением гречневой муки, высший сорт	5	2,3	6,8
Макаронные изделия, группа В, с добавлением соевой муки, высший сорт	6	2,4	7,2

Наименьшее количество сухих веществ при варке также теряют изделия, вырабатываемые из муки твердых сортов пшеницы. Наибольшая потеря сухого вещества отмечена при варке изделий с добавлением соевой муки.

Сохранность формы всех образцов составила 100%.

В целях более объективной оценки качества сваренных макаронных изделий разработана шкала балльной оценки их потребительских свойств. Для органолептической оценки выбраны следующие показатели качества: внешний вид, цвет, запах, вкус, консистенция и состояние варочной воды.

Таблица 3

Балльная оценка потребительских свойств макаронных изделий

Образец	Показатели качества						Итого
	Внешний вид	Цвет	Запах	Вкус	Консистенция	Варочная вода	
Макаронные изделия, группа А, высший сорт	25	15	10	25	15	10	100
Макаронные изделия, группа В, высший сорт	23	12	10	23	12	10	90
Макаронные изделия, группа В, с добавлением гречневой муки, высший сорт	23	12	8	20	12	9	84
Макаронные изделия, группа В, с добавлением соевой муки, высший сорт	23	12	10	23	12	9	89

По результатам балльной оценки потребительских свойств макаронные изделия подразделяют на четыре группы.

К «очень хорошим» относят изделия, которые после варки сохраняют форму, свободно отделяются друг от друга, имеют гладкую поверхность. Вкус и запах изделий – хорошо выраженные, свойственные данному изделию. Цвет – типичный, хорошо выраженный, консистенция упругая, без мучнистого ядра. Варочная вода с небольшим содержанием взвешенных частиц. Оценочный балл – не менее 90.

Для изделий группы «хорошие» допускается лёгкое слипание, более мутная после варки вода, небольшое потемнение или осветле-

ние изделий. Вкус и запах – хорошо выраженные, типичные. Оценочный балл – от 80.

Изделиям группы «удовлетворительные» присущи менее выраженные вкус и запах, заметное слипание после варки, темноватый или излишне светлый цвет, мутная вода, размягчённая консистенция. Оценочный балл – от 70.

Изделия с оценкой ниже 70 считаются «неудовлетворительными». В процессе варки нарушается их целостность, они слипаются, приобретают блёклый цвет, имеют «пустые» или очень слабо выраженные запах и вкус. Вода после варки – очень мутная или полупрозрачная с большим содержанием обломков.

В результате балльной оценки потребительских свойств макаронных изделий традиционные изделия групп А и В получили оценку «очень хорошие». Изделия ТМ «Продукт для здоровья с добавлением гречневой и соевой муки» получили более низкую оценку, поэтому отнесены к группе «хорошие» (см. табл. 3).

Выводы: На основании полученных экспериментальных данных установлено, что макаронные изделия, произведенные с добавлением гречневой и соевой муки, по показателям качества соответствуют требованиям, установленным в российских национальных стандартах, и сопоставимы с показателями качества изделий, полученных из пшеничной муки без добавок. Это дает возможность расширения ассортимента производимых продуктов с направленно измененным химическим составом, обладающих повышенной пищевой ценностью и обеспечивающих удовлетворение потребностей различных групп населения в рациональном, здоровом питании с учетом их традиций, привычек и экономического положения.

Библиографический список

Гордина Ф.В., Фавзетдинова И.Т. Пищевая ценность и экспертиза качества макаронных изделий // Агропродовольственная политика России. 2012. № 11. С. 21–25.

Малютина Т.Н., Лобосова Л.А. О приоритетных задачах развития хлебопекарной, макаронной и кондитерской промышленности в рамках решения проблемы продовольственной безопасности // Здоровье человека и экологически чистые продукты питания : ма-

териалы Всеросс. науч.-практ. конф. Орел, 2014. С. 281–286. DOI. ORG/10.20914/2310-1202-2016-4-166-171.

Осипова Г., Корячкин С. Влияние улучшителей хлебопекарной муки на качество макаронных изделий // Хлебопродукты. 2010. № 1. С. 41–43.

Субботина Н.А. Использование соевой муки в технологии производства пшеничного хлеба // Инновационные пути в разработке ресурсосберегающих технологий хранения и переработки сельскохозяйственной продукции : материалы Всеросс. науч.-практ. конф. Курган, 2017. С. 165–169.

УДК 663.45.022.3

Е.П. Каменская, С.И. Камаева, В.А. Вагнер, А.А. Теплова

*Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова (Барнаул, Россия)*

Влияние экстракта пантокрина на метаболизм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в технологии производства пива

Поиск новых путей оптимизации процессов брожения и улучшения качественных показателей продукции является одним из основных задач пивоваренного производства. Большую роль в результативности биотехнологических процессов, происходящих во время сбраживания пивного сусла, играют свойства и активность используемых дрожжей. Так, одним из актуальных направлений повышения физиологической и бродильной активности сухих дрожжей считается использование активаторов брожения природного происхождения. Исследована возможность использования в качестве активатора животного происхождения экстракта пантокрина, который содержит широкий спектр различных биологически активных веществ, факторов роста, необходимых для питания и метаболиз-

ма дрожжей. Изучено влияние различных концентраций экстракта пантокрина на физиологическое и морфологическое состояние, а также бродильную активность сухих дрожжей низового брожения *Saccharomyces cerevisiae* штамма Saflager S-23 и дрожжей верхового брожения *Saccharomyces cerevisiae* штамма Safale US-05 в технологии производства светлого пива. Определены следующие показатели физиологического состояния дрожжей: общее число дрожжевых клеток, количество почкующихся клеток, количество клеток с гликогеном, а также бродильная активность с расчетом показателя конечной степени сбраживания в динамике главного брожения пивного суслу. Установлено, что изученные экстракты пантокрина в разной степени оказывают стимулирующее действие на физиологическую и бродильную активность, морфофизиологическое состояние, рост и размножение дрожжевых клеток *S. cerevisiae* штамма Saflager S-23 и *S. cerevisiae* штамма Safale US-05. Показано, что, добавление экстракта пантокрина в количестве 1 мл/л перед подачей на главное брожение вызывает наибольший стимулирующий эффект на физиологическую активность дрожжей низового брожения *S. cerevisiae* штамма Saflager S-23, а именно способствует увеличению количества почкующихся клеток во время стационарной фазы на 21 %, клеток с гликогеном – на 25 %, общего количества жизнеспособных клеток – в два раза по сравнению с контролем. Применение экстракта пантокрина в количестве 1 мл/л для активации *S. cerevisiae* штамма Saflager S-23 позволяет повысить их бродильную активность за счет увеличения степени сбраживания суслу на 12,5 % по отношению к контролю.

Ключевые слова: дрожжи, экстракт пантокрина, штамм, гликоген, степень сбраживания, пиво, метаболизм, бродильная активность.

Улучшение качества алкогольных и слабоалкогольных напитков, соответствующих стандарту ISO 22000, – одна из основных задач современной индустрии напитков, поэтому перед бродильным производством стоят актуальные научно-технические задачи, решение которых позволит интенсифицировать технологические процессы и улучшить качественные показатели продукции (Мамарасулов и др.,

2017). Для сокращения сроков брожения и получения пива с определенным вкусом и ароматом целесообразно применять высокоактивные штаммы пивных дрожжей, свойства которых наиболее полно отвечают требованиям пивоваренного производства. Это позволяет оптимально использовать потенциальные возможности, заложенные в дрожжевой клетке, и максимально реализовать биологические резервы пивоварения (Меледина, 2003).

Большую роль в результативности биотехнологических процессов, происходящих во время сбраживания пивного сусла, играют свойства и активность используемых дрожжей, которые характеризуются различной бродильной активностью, неодинаковой способностью к потреблению питательных веществ сусла и образованием различных метаболитов (Ильяшенко и др., 2008). Поэтому целенаправленное изменение метаболизма дрожжей может улучшить физико-химические и органолептические показатели готовых спиртных напитков. В этой связи в совокупность проблем, требующих дальнейшего решения, входят вопросы оптимизации процесса брожения и поиск новых штаммов дрожжей.

Одним из направлений повышения эффективности технологических процессов в производстве пива является использование препаратов активных сухих пивоваренных дрожжей. Однако жизнеспособность таких дрожжей в большинстве случаев понижена. Поэтому для введения дрожжей в производственный цикл их необходимо активировать, т.е. запустить в них основные физиологические и биохимические процессы (активировать ферменты, процессы обмена веществ, восстановить функции митохондрий и др.). Существуют различные способы активации сухих дрожжей перед подачей их на главное брожение: введение дрожжей в часть отбираемого сусла с последующей аэрацией; добавление в сусло специальных активирующих препаратов химической природы и последующее их удаление из конечного продукта; обработка различными видами излучений; изменение физических факторов и др. (Тихомиров и др., 2007; Панасюк и др., 2010). Данные способы довольно дорогостоящие и не всегда приемлемы для мини-пивоваренных заводов, ориентированных на выпуск «живого», нефilterованного, непастеризованного и неконсервированного пива. Поэтому все более актуальным становится

поиск новых способов активации жизнедеятельности сухих дрожжей с помощью различных биологически активных веществ растительного и животного происхождения, пищевых подкормок различного состава (одно- и многокомпонентные), сочетающих в себе минеральные и органические вещества. Применение этих препаратов ускоряет разбраживание сусла, предотвращает замедление и остановку брожения, сокращает длительность процесса, способствует глубокому сбраживанию экстракта, увеличивает стойкость дрожжей к автолизу (Палагина и др., 2010).

При этом использование биологически активных веществ животного происхождения, в частности экстракта пантокрина, в технологии производства светлого пива, а также влияние его на процессы активации жизнедеятельности дрожжей изучены недостаточно. Пантокрин – биостимулятор природного происхождения, который представляет собой жидкий экстракт из молодых маральных рогов (пантов). Он содержит широкий спектр (более 80) различных биологически активных веществ (аминокислот, витаминов, микро-, макроэлементов, фосфолипидов, стерина, свободных жирных кислот, триглицеридов, гормональных компонентов и других, необходимых для питания и метаболизма дрожжей (Иванкина, 2003).

В связи с вышесказанным целью данной работы является исследование влияния экстракта пантокрина на жизнеспособность и метаболизм различных штаммов сухих пивоваренных дрожжей в технологии производства светлого пива.

Объектом исследования являлись сухие дрожжи низового брожения *Saccharomyces cerevisiae* штамма Saflager S-23 и дрожжи верхового брожения *Saccharomyces cerevisiae* штамма Safale US-05. Для проведения эксперимента использовали 12% светлое пивное сусло, полученное по классической технологии производства светлого пива. В качестве основного сырья использовались: солод пивоваренный ячменный светлый, хмель ароматный «Селект» и хмель горький «Магnum», а также экстракт пантокрина «Пантокрин пантея» (ЗАО «Эвалар», Россия). В ходе работы изучали влияние различных концентраций экстракта пантокрина (1 и 1,5 мл/л) на жизнеспособность и метаболизм сухих пивоваренных дрожжей в процессе главного брожения пивного сусла.

Дрожжевые культуры были разброжены в пивном сусле при температуре 23 ± 3 °C в течение одного часа, а затем в опытные образцы дополнительно вносился экстракт пантокрина в количествах 1 и 1,5 мл/л. Контролем служили образцы без добавления экстракта. В дрожжевой суспензии определяли количество дрожжевых клеток, норма задачи дрожжей составляла 10 млн клеток в 1 см³ сусла.

Условия эксперимента:

- 1) контроль 1 (верховое брожение, без экстракта пантокрина);
- 2) опыт 1 (конц. 1 мл/л). *S.cerevisiae* US-05;
- 3) опыт 2 (конц. 1,5 мл/л). *S.cerevisiae* US-05;
- 4) контроль 2 (низовое брожение, без экстракта пантокрина);
- 5) опыт 3 (конц. 1 мл/л). *S.cerevisiae* S-23;
- 6) опыт 4 (конц. 1,5 мл/л). *S.cerevisiae* S-23.

Главное брожение проводилось при температуре 14 °C для низового брожения и 20 °C для верхового брожения в течение семи суток с последующим охлаждением до 6–8 °C в конце брожения.

Таблица 1

Сравнительная характеристика дрожжей *S. cerevisiae* S-23
и *S. cerevisiae* US-05

Характеристика	<i>S.cerevisiae</i> S-23	<i>S.cerevisiae</i> US-05
Тип брожения	Низовое	Верховое
Температура брожения	9–22 С°	12–25 С°
Конечная плотность	Средняя	Средняя
Седиментация	Быстрая	Средняя
Флокуляция	Высокая	Средняя
Дозировка	80–120 г / гл	50–60 г / гл
Общее количество бактерий	< 5 / мл	< 5 / мл
Дикие дрожжи не <i>Saccharomyces</i>	< 1 / мл	< 1 / мл
Количество живых клеток	6×10^9 / г	6×10^9 / г
Способность к хлопьеобразованию	Высокая	Средняя

Физиологическое состояние дрожжей оценивали по общему числу дрожжевых клеток, количеству почкующихся клеток и количеству клеток с гликогеном. Бродильную активность определяли по убыли массовой доли сухих веществ с расчетом показателя конечной степе-

ни сбраживания (Качмазов, 2012). Для контроля данных показателей в процессе главного брожения отбирались опытные и контрольные образцы в следующих контрольных точках: на первые сутки брожения – на стадии лаг-фазы и завершения периода адаптации к среде дрожжевой клетки; на третьи сутки – при фазе логарифмического роста в период активного брожения; на пятые сутки – во время стационарной фазы при пике прироста дрожжевой биомассы; на седьмые сутки – в фазу завершения главного брожения.

Используемые дрожжи обладали различными технологическими характеристиками, представленными в таблице 1.

Важным фактором, определяющим эффективность пивоваренного производства, служит физиологическое состояние дрожжевых клеток. Одним из главных показателей физиологического состояния дрожжей является их общее количество в сусле, которое определяли методом подсчета в счетной камере Горяева на протяжении всего периода главного брожения (рис. 1).

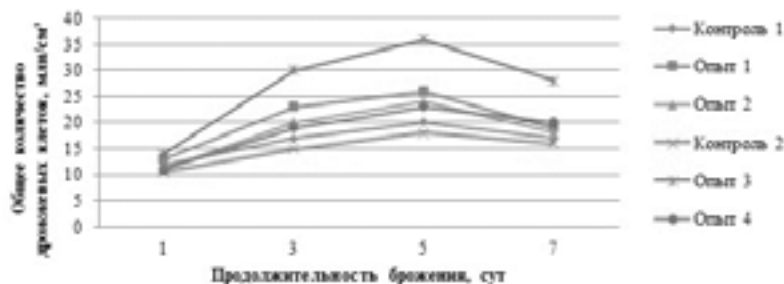


Рис. 1. Влияние экстракта пантокрина на общее количество дрожжевых клеток

Как видно из рисунка 1, обработка дрожжей перед засевом экстрактами пантокрина в целом способствует их большей физиологической устойчивости. Так, во всех опытных образцах отмечалась устойчивая динамика к увеличению количества клеток на 5-е сутки по сравнению с контрольными образцами, при этом максимальное количество клеток – 36 млн/см³, было выявлено в образце 3 с использованием низовых дрожжей *S. cerevisiae* S-23, активированных экстрактом пантокрина (1мл/л), что превышало в два раза их количество в контроле.

Известно, что одним из важных резервных веществ дрожжевых клеток является гликоген, который способен накапливаться в цитоплазме клетки, при этом он окрашивается раствором Люголя в коричневатый цвет. Анализируя характер изменения содержания гликогена в дрожжах, можно установить соответствие полноценности состава питательной среды для развития микроорганизмов. Данные эксперимента приведены на рисунке 2.

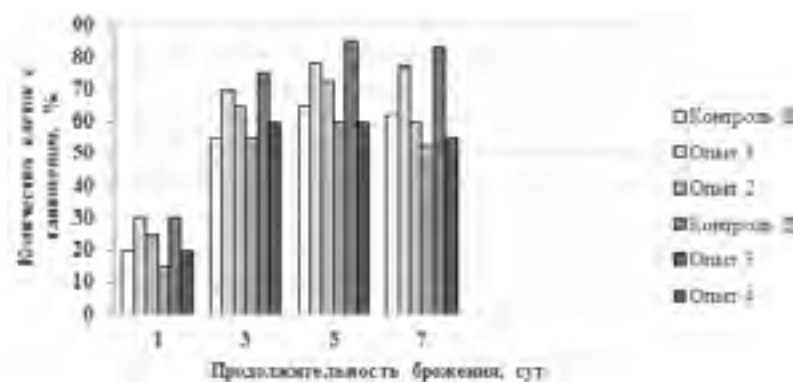


Рис. 2. Влияние экстракта пантокрина на количество клеток с гликогеном

Данные по количеству клеток с гликогеном в опытных образцах также показали результат выше по сравнению с контрольными образцами. При этом лучшие результаты были получены при активации сухих дрожжей низового брожения *S. cerevisiae* штамма Saflager S-23 и дрожжей верхового брожения *S. cerevisiae* штамма Safale US-05 экстрактом пантокрина в дозировке 1 мл/л, которые составили в стационарной фазе 85 и 78% соответственно.

Способность дрожжей к размножению характеризует количество почкующихся клеток. Число клеток с почками подсчитывали под микроскопом в 10 полях зрения и выражали в процентах к общему количеству. Результаты опыта представлены на рисунке 3.

Как видно из представленных данных, применение экстракта пантокрина в исследуемых концентрациях приводит к увеличению числа почкующихся клеток во всех опытных образцах, при этом максимальное их количество было отмечено на 5-е сутки в опытных об-

разцах 3 и 4 с использованием низовых дрожжей *S.cerevisiae* S-23. Показатели почкующихся клеток в этих образцах превысили контроль в случае использования экстракта пантокрина в концентрации 1 мл/л на 21%, а при использовании экстракта пантокрина в концентрации 1,5 мл/л – на 10%.

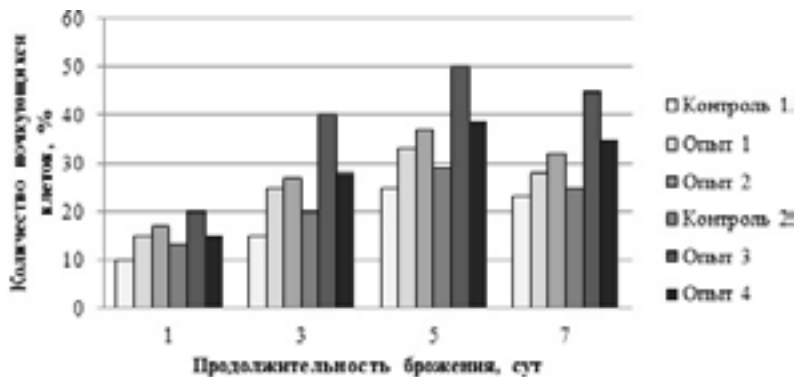


Рис. 3. Изменение количества почкующихся дрожжевых клеток при использовании экстракта пантокрина

Положительный физиологический эффект, выявленный у клеток дрожжей при воздействии на них экстракта пантокрина, видимо, можно объяснить наличием в экстракте таких факторов роста, как аминокислоты (порядка 18), микроэлементы (магний, медь, железо и др.) и витамины группы В (тиамин, рибофлавин, пиридоксин и др.), которые стимулируют рост и размножение дрожжей за счет повышения активности клеточных ферментов, действия в некоторых ферментативно катализируемых реакциях в качестве кофакторов. Кроме того, содержащиеся в экстрактах пантокрина различные гормоны (тестостерон, эстрадиол и др.), инсулиноподобные факторы роста I и II, интерлейкины -2, -6 способны связываться с рецепторами на поверхности клеточных мембран. В результате происходит активация ферментов, в частности, аденилатциклазы, которая катализирует превращение АТФ в циклический АМФ, запускающий все ферментные системы, связанные с метаболизмом дрожжевой клетки.

Известно, что различные стадии главного брожения пивного сусла характеризуются изменением не только внешнего вида поверх-

ности бродящего сусла, но и температуры, а также понижением экстрактивности сусла. Конечная степень сбраживания является важным показателем технологической оценки углеводного состава сусла и характеризует физиологические возможности исследуемых дрожжей, имеющие решающее значение в оптимизации технологического процесса. Поэтому далее в динамике проводился анализ изменения массовой доли сухих веществ в процессе главного брожения рефрактометрическим способом с последующим расчетом показателя конечной степени сбраживания. Динамика сбраживания сухих веществ опытных и контрольных образцов сусла представлена на рисунке 4.

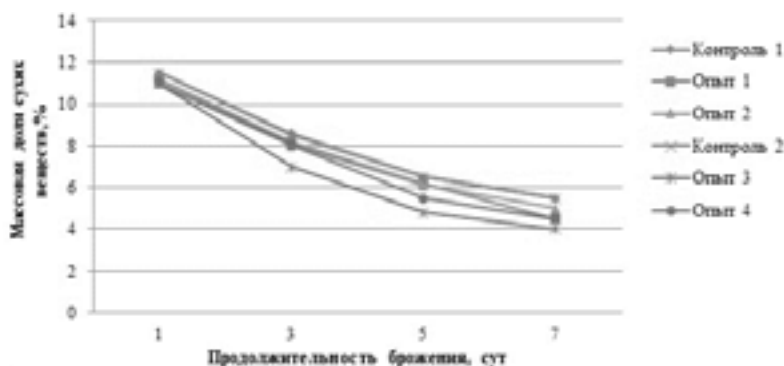


Рис. 4. Изменение массовой доли сухих веществ при использовании экстракта пантокрина в процессе главного брожения пивного сусла

Анализ экспериментальных данных показал, что все опытные и контрольные образцы сусла при равной задаче в 10 млн клеток см³ достигли положенной видимой концентрации сухих веществ на седьмые сутки брожения, при этом в опытных образцах конечная степень сбраживания была выше контрольных показателей: для низовых дрожжей *S. cerevisiae* штамма Saflager S-23 в среднем на 10,6 %, а для верховых дрожжей *S. cerevisiae* штамма Safale US-05 – на 6,4%. Также следует отметить, что более интенсивно шло низовое брожение в образцах 3 и 4, для которых степень сбраживания составила 66,7 и 62,5% соответственно.

В целом, на основании проведенных исследований можно предположить, что изученные экстракты пантокрина в разной степени

выступают в качестве метаболических корректоров функциональной активности дрожжевых клеток *S. cerevisiae* штамма Saflager S-23 и *S. cerevisiae* штамма Safale US-05.

При этом добавление экстракта пантокрина в качестве активатора в количестве 1 мл/л перед подачей на главное брожение оказывает наибольший стимулирующий эффект на физиологическую активность дрожжей низового брожения *S. cerevisiae* штамма Saflager S-23, а именно способствует увеличению количества почкующихся клеток во время стационарной фазы на 21%, клеток с гликогеном – на 25%, общего количества жизнеспособных клеток – в два раза по сравнению с контролем. Применение экстракта пантокрина в количестве 1 мл/л для *S. cerevisiae* штамма Saflager S-23 позволяет также повысить их бродильную активность за счет увеличения степени сбраживания сусла на 12,5% по сравнению с контролем.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать использование экстракта пантокрина в количестве 1мл/л в технологии производства светлого пива в качестве активатора сухих дрожжей низового брожения *S. cerevisiae* штамма Saflager S-23 для стимуляции основных жизненных функций культуры, интенсификации процесса размножения, увеличения их физиологической и бродильной активности.

Библиографический список

- Иванкина Н.Ф. Исследование химического состава и биологической активности пантов, вторичного сырья пантового оленеводства в технологии получения кормовых добавок. Благовещенск, 2003. 110 с.
- Ильяшенко Н.Г., Бетева Е.А., Пичугина Т.В., Ильяшенко А.В. Микробиология пищевых производств. М., 2008. 412 с.
- Качмазов, Г. С. Дрожжи бродильных производств. СПб., 2012. 224 с.
- Мамарасулов, Б.Д., Насирова О.А., Мирзарахметова Д.Т. Интенсификация процесса сбраживания пивного сусла // Пиво и напитки. 2017. № 5. С. 24–27.
- Меледина Т. В. Сырье и вспомогательные материалы в пивоварении. СПб., 2003. 304 с.
- Палагина М.В., Зимба А.Г., Макарова А.А. Разработка технологии но-

вых сортов пива специального с добавлением растительных экстрактов // Пиво и напитки. 2010. № 4. С. 30–32.

Панасюк А.Л., Шишков Ю.А. Интенсификация процесса брожения яблочного сусла с использованием активированной биомассы дрожжей // Виноделие и виноградарство. 2010. № 5. С. 14–15.

Тихомиров В.Г., Хныкин А.М. Пиво и его производство. М., 2007. 157 с.

УДК 663.8.022.3

М.Н. Колесниченко, В.А. Вагнер, И.Б. Дворяткина

*Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова (Барнаул, Россия)*

Перспективы использования кипрея узколистного в биотехнологии производства безалкогольных напитков

Создание полезных безалкогольных напитков на основе растений, содержащих биологически активные вещества, произрастающих на территории Алтайского края, особенно актуально. Данная работа заключается в практическом применении экстрактов кипрея как источника полифенольных соединений, витаминов и микроэлементов в производстве функциональных напитков.

Полезные напитки из кипрея могут составить конкуренцию на рынке напиткам из чайных листьев. В отличие от чайных листьев, экстракт из кипрея не содержит в своем составе кофеин.

Разработана технология производства приготовления функционального негазированного безалкогольного напитка на основе экстракта из кипрея, полученного водно-ферментативным способом на одну стадию с применением ферментов.

Основными этапами приготовления безалкогольного напитка с экстрактом кипрея являются: подготовка воды, приготовле-

ние сахарного сиропа, купаживание выбранных ингредиентов в виде концентрированного сиропа, добавлении экстракта кипрея с ферментными препаратами и концентрированного сока брусники и лимонного сока, доведение водой концентрированного сиропа до нужной кондиции. Все ингредиенты, имеющие осадок, при необходимости на производстве могут подвергнуться фильтрации.

Полученный купажный сироп разбавляется подготовленной водой и фасуется в бутылки, предпочтительно темного цвета для предотвращения разрушения Р-активных веществ. Таким образом, экстракт, полученный из ферментированного кипрея, может стать основным компонентом функциональных напитков, так как имеет высокое содержание полифенольных веществ, и в частности Р-активных соединений, удовлетворяющих суточную потребность человека в рутине.

Ключевые слова: безалкогольные напитки, кипрей, актуальность, экстракты, биотехнология, купаживание, сухие вещества, флавоноиды, полифенолы.

Наиболее популярными безалкогольными функциональными напитками для массового потребления являются напитки, содержащие натуральные природные компоненты. Эти напитки обогащены витаминами, минеральными веществами, ненасыщенными жирными кислотами и пищевыми волокнами, которые способствуют предупреждению сердечно-сосудистых и желудочно-кишечных заболеваний, онкологических и других болезней. Основные компоненты напитков – вода, часто минеральная, фруктовые и овощные соки или их смеси, молочная сыворотка, пряно-ароматические экстракты трав (Бушуева, 2016).

Создание полезных безалкогольных напитков на основе растений, содержащих биологически активные вещества, произрастающих в Алтайском крае, особенно актуально. Данная работа заключается в практическом применении экстрактов кипрея как источника полифенольных соединений, витаминов, микроэлементов и других биологически активных веществ в производстве функциональных напитков.

Кипрей узколистый (*Chamaenerion angustifolium* (L.) Holub; *Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop.; *Epilobium angustifolium* L.) – многолетнее травянистое растение высотой 60–150 см, с монотрихными побегами. Цикл развития побега завершается в течение одного вегетационного периода. В профилактических целях чаще всего используют листья и цветки кипрея (иван-чая), собираемые в период цветения этого растения (Данников, 2016). Кипрей содержит: флавоноиды (кверцетин, кемферол), оказывающие спазмолитическое, желчегонное и мочегонное действие; дубильные вещества (до 20% дубильных веществ пирогаловой группы, обладающих вяжущим, противовоспалительным и кровоостанавливающим действием); слизи (до 15%, что обеспечивает смягчительные и обволакивающие свойства, способность снимать воспаления, утолять боли, успокаивать и снимать судороги); небольшое количество алкалоидов (эти вещества в больших дозах ядовиты, но в малых обладают замечательными лечебными свойствами, способны улучшать обмен веществ, кровообращение, состояние нервной системы, являются хорошими обезболивающими); хлорофилл (зеленый пигмент растений, поглощающий световую энергию, стимулирует заживление ран, улучшает обмен веществ); пектин (это вещество увеличивает срок хранения чая); полифенолы (являются мощными антиоксидантами). В листьях присутствуют витамины, особенно много каротина и витамина С (до 200–388 мг – в три раза больше, чем в апельсинах). Корни богаты крахмалом, полисахаридами, которые участвуют в иммунных реакциях, органическими кислотами. Кроме того, в листьях иван-чая найдено большое количество микроэлементов, стимулирующих кроветворение и необходимых для обмена веществ – железо, медь, марганец, никель, титан, молибден, бор. По своим противовоспалительным свойствам иван-чай превосходит все лекарственные растения – научно доказано, что у него самый высокий среди растений коэффициент противовоспалительного действия. А по своему успокоительному действию, уменьшающему чувство напряжения, тревоги, страха, ему вообще нет равных. В народной медицине иван-чай издавна считается также противоопухолевым средством. И научные исследования подтвердили многовековой опыт травников, поскольку из соцветий иван-чая было выделено высокомолекулярное соеди-

нение ханерол, которое проявляет противоопухолевую активность, имеет относительно низкую токсичность и широкий спектр воздействия на опухоли (Царёв, 2016).

В настоящее время большое внимание уделяют здоровому образу жизни, что означает употребление в пищу только полезных напитков и продуктов питания без добавления химических добавок и ароматизаторов. Поэтому на основании анализа литературных источников можно понять, что кипрей прекрасно подходит для приготовления напитков на его основе. Из-за своего состава и всех полезных свойств напитки из кипрея могут составить конкуренцию на рынке напиткам из чайных листьев. В отличие от чайных листьев, экстракт из кипрея не содержит в своем составе кофеин (Полежаева, 2005).

При анализе рынка было выявлено, что основное использование кипрея узколистного заключается в производстве фиточая.

Целью нашей работы явилась разработка технологии производства функционального негазированного безалкогольного напитка на основе кипрея с применением ферментных препаратов. Работа производилась на кафедре технологии броидильных производств и виноделия Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова.

В качестве объекта исследования были выбраны два образца сухого кипрея, собранного в Алтайском крае. Образец №1 – травяной чай «Иван-чай», в состав которого входят листья кипрея узколистного, производитель ООО НПФ «Алтайский букет».

Образец №2 – фиточай «Иван-чай», в состав которого входят листья кипрея узколистного, производитель ООО «Алтэя».

На основании анализа литературных данных, рецептур по приготовлению напитков из экстракта кипрея не найдено. Новизна исследования заключалась в применении двух способов экстракции на основе водной вытяжки с использованием ферментных препаратов – протосубтилин Г10х и Целлолюкс А. В качестве контрольного образца использовали экстракт, полученный завариванием и настаиванием, рекомендованными для фиточаев.

Комплексный ферментный препарат бактериального происхождения – Протосубтилин Г10х является продуктом деятельности бактерий штамма *Bacillus subtilis*. Протосубтилин катализирует рас-

щепление растительных белков, т.е. обеспечивает разрыв связи – CO – NH – с образованием пептидов низкого молекулярного веса и аминокислот, увеличивает выход готового продукта. Протеолитическая активность протосубтилина составляет 70 ед/г. Максимальная активность препарата проявляется в температурном диапазоне от 30 до 45 °С и при pH 5,5–6,5. Из цитолитических ферментных препаратов был использован ЦеллоЛюкс А, который продуцируется культурой гриба *Trichoderma viride* и проявляет ксиланазную, целлюлазную и β -глюканазную активность. Общая цитолитическая активность равна 2000 ед./г.



Рис. 1. Схема получения экстракта завариванием



Рис. 2. Схема получения экстракта водно-ферментативным настаиванием в одну стадию

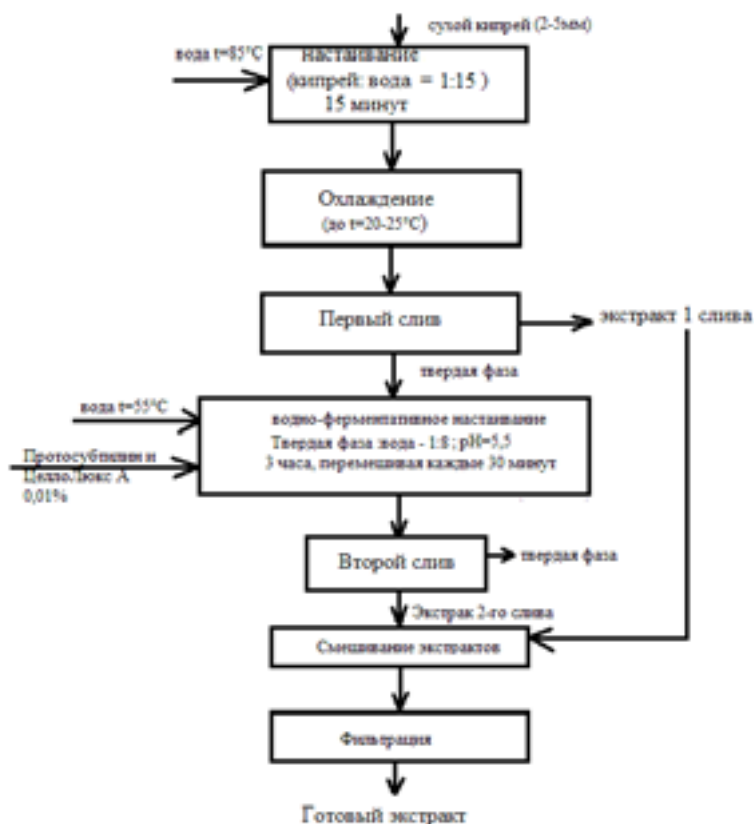


Рис. 3. Схема получения экстракта водно-ферментативным настаиванием в две стадии

Контрольными образцами № 1 и № 2 выбраны экстракты кипрея разных производителей, полученные завариванием кипяченной водой температурой 90–95°C в течение 15 минут (рис. 1). Для соблюдения одинаковых условий с двумя последующими экспериментальными опытами при заваривании сохраняли соотношение воды и измельченного сырья в соотношении 1:15.

Опытные образцы из экстрактов кипрея получали двумя способами:

Первый способ состоял из одной стадии и заключался в экстрагировании кипрея водным раствором с добавлением в равных количествах смеси ферментных препаратов – протосубтилин Г10х и ЦеллоЛюкс А в количестве 0,5% от массы сухого сырья при pH = 5,5 (образцы №3 и № 4). Температура экстракции составляла 50 °С в течение трех часов при перемешивании каждые 30 минут (см. рис. 2).

Второй способ заключался в получении экстракта кипрея в две стадии (образцы №5 и № 6):

1. Высушенный кипрей заливали водой, температура которой равна 85 °С, в соотношении 1:15 и оставляли настаиваться 15 минут.
2. Отфильтрованные частицы заливали водой в соотношении 1:8 и добавляли при pH = 5,5 смесь ферментных препаратов (протосубтилин Г10х и ЦеллоЛюкс А) в количестве 0,01% от массы сухого сырья. Температура экстрагирования составляла 55 °С в течение трех часов при перемешивании каждые 20 минут. Затем экстракт отделяли от твердой части и смешивали его с экстрактом, полученным на первой стадии. Полученную смесь фильтровали (см. рис. 3).

В экстрактах кипрея, изготовленного двумя способами, и в контрольных образцах определили физико-химические показатели качества (массовую долю сухих веществ, содержание рутина, общую сумму полифенолов).

Результаты физико-химических показателей представлены в таблице.

Физико-химические показатели экстрактов кипрея, полученных двумя способами экстракции

№ экстракта	Массовая доля сухих веществ, %	Общее содержание полифенольных веществ, мг/дм ³	Массовая доля флавоноидов в пересчете на рутин, мг/100 см ³
1 (к)	0,7	832,96	64
2 (к)	0,7	644,28	57,6
3	0,8	1378,21	76,8
4	0,7	996,51	70,4
5	0,9	1281,66	64
6	0,8	969,66	64

Из таблицы следует, что по массовой доле сухих веществ в опытных образцах максимальные значения получены в образцах № 5 и № 6 – 0,9 и 0,8%, по сравнению с контрольным образцом увеличение составило 28,6 и 14,3 % соответственно.

По общему содержанию полифенольных веществ наибольшее значение получили образцы № 3 и № 5 – 1378,21 и 1281,66 мг/дм³. В сравнении с контрольным образцом увеличение составило 65,5 и 53,9 % соответственно.

По массовой доле флавоноидов в пересчете на рутин наибольшее содержание получено в двух опытных образцах – № 3 и № 4 (76,8 и 70,4 мг/100 см³), повышение по сравнению с контрольным образцом составило 20,0 и 22,2 % соответственно.

Водно-ферментативное экстрагирование показывает лучший результат по массовой доле сухих веществ, общему содержанию полифенольных веществ и массовой доле флавоноидов в пересчете на рутин. Однако одностадийный способ выгодно отличается от двухстадийного по содержанию полифенольных соединений и рутина.

Разработана технология производства безалкогольного негазированного напитка на основе экстракта из кипрея. В качестве вкусо-ароматического сырья для приготовления безалкогольного напитка на основе экстракта из кипрея взяли брусничный и лимонный соки. Кислотность корректировали лимонной кислотой.

Основными технологическими этапами приготовления готового безалкогольного напитка являются: подготовка воды, приготовление сахарного сиропа, купажирование выбранных ингредиентов в виде концентрированного сиропа, добавлении ферментных препаратов, доведение водой концентрированного сиропа до нужной кондиции. Сначала добавляли сахарный сироп, затем экстракт кипрея, полученный в одну стадию с применением ферментных препаратов, концентрированный сок брусники и лимонный сок.

Полученный купажный сироп разбавляли подготовленной водой и фасовали в бутылки, предпочтительно темного цвета, для предотвращения разрушения Р-активных веществ.

Технологическая схема производства функционального негазированного безалкогольного напитка на основе экстракта кипрея представлена на рисунке 4.



Рис. 4. Технологическая схема производства функционального негазированного безалкогольного напитка на основе экстракта кипрея с применением ферментных препаратов

Таким образом, экстракт кипрея, полученный одностадийным способом настаивания с применением ферментных препаратов, может являться основным компонентом функциональных напитков. А технологическая схема производства использована в биотехнологии производства функциональных безалкогольных негазированных напитков.

Выводы. Установлено, что одностадийный способ настаивания экстракта кипрея с применением смеси ферментных препаратов в количестве 0,5 % от массы сухого сырья являлся оптимальным по физико-химическим показателям (по содержанию массовой доли флавоноидов в пересчете на рутин и по общему содержанию полифенольных веществ).

Разработана технологическая схема производства функционального негазированного безалкогольного напитка на основе экстракта кипрея в одну стадию с применением ферментных препаратов.

Библиографический список

- Бушуева Г.Р., Сыроешкин А.В., Максимова Т.В., Скальный А.В. Кипрей узколистый – перспективный источник биологически активных соединений // Микроэлементы в медицине. 2016. С.15–23.
- Данников Н.И. Целебный иван-чай. М., 2016. 220 с.
- Кипрей, полезные свойства и противопоказания [Электронный ресурс]. URL: <http://prokalorijnost.ru/kiprej-poleznye-svoystva-i-protivopokazaniya>.
- Полежаева И.В., Полежаева Н.И., Меняйло Л.Н., Павленко Н.И., Левданский В.А. Изучение экстрактивных веществ *Chamaenerion Angustifolium* (L.) Holub, 2005. 5 с.
- Царёв В.Н., Базарнова Н.Г., Дубенский М.М. Кипрей узколистый (*Chamaenerion Angustifolium* L.) – химический состав, биологическая активность // Химия растительного сырья. 2016. №4. С. 15–26.

УДК 664.663.9

Е.А. Кузнецова¹, Л.В. Шаяпова¹, Я. Бриндза²

¹Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева (Орёл, Россия)

²Словацкий аграрный университет в Нитре (Нитра, Словакия)

Технология хлеба из зерна тритикале, обогащенного флавоноидами гречихи

Цель работы состоит в разработке технологии хлеба из зерна тритикале, обогащенного флавоноидами гречихи. В работе использовали ферментированное сырье: зерно тритикале сорта Немчиновская 56 предварительно обрабатывали ферментным препаратом на основе целлюлаз. Порошок флавоноидов получали из шелухи гречихи сорта Башкирская красностебельная. В рецептуру зернового хлеба входила также мука пшеничная высшего сорта. Выработанный по предложенной технологии зерновой хлеб имеет показатели каче-

ства, сопоставимые с контролем, приготовленным по ГОСТ 25832, и обладает повышенной антиоксидантной активностью и пищевой ценностью.

Ключевые слова: технология; тритикале; зерно; хлеб; гречиха; флавоноиды.

Зерновые хлебобулочные изделия отличаются повышенным содержанием биологически активных веществ и пищевых волокон. Известно, что при регулярном употреблении хлеба из целого зерна организм очищается от шлаков, канцерогенных и токсичных веществ, нормализуются обменные процессы, улучшается моторика кишечника, снижается риск заболеваний сердечнососудистой системы. Перспективной культурой для расширения сырьевой базы хлебопекарной промышленности в технологии зерновых хлебобулочных изделий является тритикале. Хлеб из зерна тритикале обладает повышенным содержанием полноценного белка, незаменимых аминокислот и минеральных веществ (Pashchenko et al., 2003). Ранее нами разработаны технологии хлебобулочных изделий из зерна тритикале, которые можно отнести к специфическим диетическим продуктам (Koryachkina et al., 2007; Kuznetsova et al., 2010). Одним из технологических приемов, применяемых в технологии хлеба из зерна тритикале, является использование для размягчения прочных покровов зерна ферментных препаратов на основе целлюлаз, которые катализируют гидролиз целлюлозы, гемицеллюлоз, β -глюкана, входящих в структуру матрикса клеточных стенок (Kuznetsova et al., 2016). Флавоноиды гречихи оказывают положительные эффекты при лечении гипотонии, обладают инфламаторным и противоаллергенным действием (Kim et al., 2003; Kim et al., 2004). С целью улучшения полезных свойств хлеба из зерна тритикале большой интерес представляет его обогащение порошком из флавоноидов гречихи.

Объектами исследования было зерно тритикале сорта Немчиновская 56, выращенное в Орловском районе Орловской области, а также шелуха семян гречихи посевной сорта Башкирская красностебельная, любезно предоставленная лабораторией селекции крупных культур ФГБНУ ВНИИЗБК (Орловский район Орловской об-

ласти). В работе использованы стандартные и общепринятые методы исследования физико-химических и биохимических свойств готовых зерновых хлебобулочных изделий. Органолептическую оценку хлеба проводили в соответствии со шкалой балльной оценки, предложенной во МГУПП. Антиоксидантную активность образцов сырья и готовых хлебобулочных изделий определяли спектрофотометрическим методом в спиртовом экстракте, описанным (Silva et al., 2005) и основанным на определении процента ингибирования радикала DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил). Определена оптическая плотность растворов при взаимодействии DPPH с экстрактивными веществами растений на спектрофотометре «Спекорд М40» (Carl Zeiss Industrielle Messtechnik GmbH, Германия) при длине волны 515 нм. Содержание макро- и микроэлементов определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре Hitachi 180-80, содержание витаминов – методом ВЭЖХ на приборе «Милихром УФ-5».

Порошок флавоноидов получали экстракцией шелухи зерна гречихи, имеющей влажность не более 8 % и измельченной до среднего размера частиц 0,5 мм. Экстракцию проводили 80% водно-спиртовым раствором этилового спирта в течение 120 мин при температуре 80 °С, при соотношении сырья: экстрагент 1:100. Порошок флавоноидов шелухи гречихи получали путем упаривания на ротаторном испарителе при температуре 80 °С. Затем полученный густой экстракт подвергали сушке при температуре 45 °С. Порошок флавоноидов использовали при разработке технологии хлеба из зерна тритикале.

Зерно тритикале предварительно обрабатывали ферментным препаратом целлюлолитического действия Целловиридин Г20х (продуцент *Trichoderma reesei*), который содержит комплекс ферментов целлюбогидролазу, ксиланазу, β -глюканазу. Ферментный комплекс препарата способствует модификации структуры некрахмальных полисахаридов клеточных стенок зерна, что способствует ускорению процессов проникновения влаги в зерно и синтеза биологически активных соединений. Рациональная дозировка препарата была установлена экспериментальным путем и составила 0,12 % к массе сухих веществ зерна. Обработку зерна проводили в растворе ферментного препарата в цитратном буферном растворе pH 5,0 при температуре 45 °С, гидромодуль 1:1. Продолжительность воздействия ферментно-

го препарата составила 8 часов. После ферментации осуществляли промывание зерна водой в течение 5–10 минут. Затем ферментированное зерно тритикале подвергали сушке в установке сушильной конвейерной СК-70 в течение 120–180 мин при $t = 50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Измельчение зерна проводили на мельнице WM-200 до дисперсности 0,06–0,08 мкм.

На следующем этапе исследования была разработана технология хлеба из целого зерна тритикале, обогащенного флавоноидами гречихи. В таблице 1 приведена рецептура хлебобулочного изделия из зерна тритикале.

Таблица 1

Рецептура хлебобулочных изделий, кг/100 кг муки

Наименование сырья	Содержание рецептурных компонентов
Мука из ферментированного зерна тритикале	80.0
Мука пшеничная хлебопекарная высшего сорта	20.0
Порошок флавоноидов из экстракта гречневой шелухи	2.0
Дрожжи хлебопекарные прессованные	2.0
Соль поваренная пищевая	1.7
Вода	По расчету
Влажность теста, %	48.0
Конечная кислотность теста, град	4.5

Замес теста осуществляли безопарным способом из всего сырья. В качестве контроля выступал хлеб зерновой, приготовленный в соответствии с ГОСТ 25832. При этом был использован непрерывный замес, имеющий большие преимущества, так как он сокращает производственный цикл и повышает производительность труда.

Тесто оставляли на брожение в условиях термостата при температуре 28–32 °С и относительной влажности воздуха 75–85 %. По истечении каждого часа брожения производили обминку и определение кислотности теста. Тесто отправляли на разделку по достижению

им кислотности 4,5–5,0 град. На основании экспериментальных данных продолжительность процесса брожения опытных образцов теста составила 2–2,5 часа.

По окончании брожения готовое тесто разделявали на куски массой 0,25 кг, придавая тестовым заготовкам округлую форму, и помещали на расстойку. Данную технологическую стадию проводили при температуре 35–40 °С и относительной влажности воздуха 75–85% в течение 35–40 минут. Выпечку изделий осуществляли при температуре 200–220 °С в течение 30–35 минут.

Через четыре часа после выпечки осуществляли анализ качества хлебобулочных изделий. Готовые изделия оценивались по органолептическим и физико-химическим показателям. Разработанные хлебобулочные изделия по органолептическим показателям не отличаются от контроля. Физико-химические показатели качества хлебобулочного изделия приведены в таблице 2.

Таблица 2

Физико-химические показатели качества хлебобулочного изделия

Показатель флавоноидов гречихи	Контроль по ГОСТ 25832	Хлеб из зерна тритикале с порошком
Пористость, %	61	63
Удельный объем, см ³ /г	2.00	1.98
Кислотность, град	3.1	3.0
Формоустойчивость, Н:Д	0.41	0.38

Разработанный хлеб имел показатели качества, сопоставимые с контрольным вариантом. Была определена антиоксидантная активность разработанного хлебобулочного изделия. Она составила 23,8 % ингибирования радикала DPPH, в то время как для контрольного варианта антиоксидантная активность была равна 9,8 % ингибирования радикала DPPH. В разработанном хлебобулочном изделии суммарное количество макроэлементов увеличилось на 28 %, микроэлементов – на 42 %, витаминов – на 24,5 % по сравнению с контрольным вариантом. Содержание пищевых волокон в хлебе превышает их количество в контроле в 1,8 раз, а общее содержание низкомолекулярных углеводов снижается на 7,5%. Таким образом, на основании

проведенных исследований установлено, что хлеб из зерна тритикале в смеси с мукой пшеничной высшего сорта с порошком флавоноидов гречихи обладает повышенной пищевой ценностью и антиоксидантной активностью. Показано, что разработанный зерновой хлеб имеет показатели качества, сопоставимые с контролем, приготовленным по ГОСТ 25832. Разработанный хлеб может пополнить ассортимент специфических диетических продуктов.

Данная статья была подготовлена при активном участии исследователей международной сети AgroBioNet. Соавтор Елена Анатольевна Кузнецова (проект № 51700804) благодарит Международный Вышеградский стипендиальный фонд за предоставленную финансовую поддержку и возможность проведения исследований в современных лабораториях Института сохранения биоразнообразия и биобезопасности факультета агробиологии и пищевых ресурсов Словацкого сельскохозяйственного университета в Нитре.

Библиографический список

- Kim C.D., Lee W-K., No K-O., Park S-K., Lee M-H., Lim S. R., Roh S-S. Anti-allergic action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain extract // International Immunopharmacology. 2003. V. 3. P. 129–136.
- Kim S.L., Kim S.K., Park C.H. Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable // National Food Research Institute. 2004. V. 37. P. 319–327.
- Koryachkina S., Kuznetsova Ye., Cherepnina L. Use of triticale in technology of whole grain bread // Khleboproducty. 2007. № 5. P. 38–39
- Kuznetsova E., Motyleva S., Mertvisheva M., Zomitev V., Brindza J. Composition and microstructure alteration of triticale grain surface after processing by enzymes of cellulase complex // Potravinarstvo. 2016. V. 10. I. 1. P. 23–29. DOI: 10.5219/411
- Kuznetsova Ye.A., Cherepnina L.V. Mathematical substantiation of selection of fermentable preparations in technology of bread from grain triticale // Storage and processing of farm products. 2010. № 2. P. 42–44.
- Pashchenko L. P., Stranadko G. G., Lubar A. V., Pashchenko L. Y. By-products of triticale grain in the technology of bakery products // Bulletin of the Russian Academy of Agriculture Sciences. 2003. №2. P. 84–86.

Silva B.A., Ferreres F., Malva J.O., Dias A.C.P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts // Food Chemistry. 2005. Vol. 90, N 1-2. P. 157–167. DOI: 10.1016

УДК 57.04

И.И. Кульбакина, К.В. Дмитриева, Е.Г. Ильина, Е.С. Яценко
Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Влияние физико-химических факторов на *Bacillus subtilis*

Препараты на основе *Bacillus subtilis* используются для получения пробиотиков, биологических фунгицидов, биологических дезинфектантов, биоконсервантов. При их производстве особое значение имеет технологический контроль за всеми стадиями производственного процесса, а также анализ качества готовой продукции.

Центрифугирование – одна из основных стадий практически любого технологического процесса в биотехнологии при производстве пробиотиков.

Проведенное исследование позволило определить влияние центрифугирования на рост вегетативных клеток *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079. Воздействие центрифугированием проводили в течение 1, 2, 10, 15, 20 минут, при 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 14500 оборотах в минуту.

Из приведённых данных очевидно, что при центрифугировании микроорганизмы *Bacillus subtilis* испытывают депрессию. Количество выживших колоний сокращается. Можно предположить, что центрифугирование отрицательно влияет на рост бактерий из-за разности осмотического давления внутри клетки и внешнего давления, которые оказывает центрифуга. При этом возникает сдвиг и напряжение, создаваемое центробежной силой. Как следствие, клеточная мембрана или растущая клеточная стенка рвется. Клетка, которая

не может адаптироваться к этим условиям, погибает. Резкий скачок КОЕ (колониеобразующая единица) наблюдается только при центрифугировании в течение 5 минут при 6000 оборотах в минуту.

Известно, что клетка способна со временем приспосабливаться к агрессивным для нее условиям внешней среды. Исходя из полученных данных можно предположить, что 8000 и 14500 оборотов в минуту достаточно, чтобы клетка начинала активно сопротивляться. При центрифугировании в таких условиях со временем количество колоний увеличивается.

В целом, центрифугирование как стадия технологического процесса будет негативно влиять на численность *Bacillus subtilis*. Возникающее при этом давление обладает потенциальной способностью оказывать на живые организмы разрушительное действие. Если центрифугирование как стадия процесса незаменима и необходима, то рекомендуется проводить его при 6000 оборотов в минуту, с наименьшим показателем ускорения в течение 5 минут. Кроме того, рекомендуется заменить центрифугирование микрофльтрацией.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, центрифугирование, колониеобразующая единица.

Введение. Препараты на основе *Bacillus subtilis* используются для получения пробиотических средств, биологических фунгицидов, биологических дезинфектанов, биоконсервантов и т.д. При их производстве особое значение имеет технологический контроль за всеми стадиями производственного процесса, а также анализ качества готовой продукции. Так как количество живых бактерий в готовом продукте один из самых важных показателей качества.

В микробиологии и иммунологии находят все более широкое применение различные физические и химические факторы, в частности, температура, центрифугирование, ультразвук, свет и т.д. Центрифугирование – одна из основных стадий практически любого технологического процесса в биотехнологии при производстве пробиотиков.

Проведенное исследование позволяет определить влияние центрифугирования на рост вегетативных клеток *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079.

Материалы и методы исследований. В качестве исходного штамма использовали штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ -12079.

Исследуемый биологический препарат представляет собой сухой порошок из лиофильно высушенных бактерий штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ -12079. Содержание спор бактерий составляет не менее 5·10⁹ КОЕ/г.

Этот штамм входит в состав Энзимспорина. Он содержит спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis* ВКМ В-2998D (ВКПМ В-314), *Bacillus licheniformis* ВКМ В-2999D (ВКПМ В-8054), *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057D (ВКПМ В-12079) в равных соотношениях и наполнители – сухую молочную сыворотку, мальтодекстрин, кукурузную муку. Входящие в состав кормовой добавки живые бактерии рода *Bacillus* предотвращают колонизацию кишечника условно-патогенными микроорганизмами.

Для центрифугирования были использованы три центрифуги:

- 1) микроцентрифуга «MiniSpin plus»;
- 2) Сигма 2-16Р;
- 3) Сигма 4-16С.

Для выращивания, поддержания и хранения культуры использовали агаризованную среду следующего состава (г/л): агар-агар – 18, дрожжевой экстракт – 5, пептон – 15, хлорид натрия – 5, дистиллированная вода – до 1 л (рН 6,8–7,0).

Для культивирования использовали вегетативную среду (г/л): дрожжевой экстракт – 5, пептон – 15, хлорид натрия – 5, дистиллированная вода – до 1 л (рН 6,8–7,0).

Готовые среды стерилизовали автоклавированием в течение 30 минут при давлении 1,1 кгс/см³.

Условия культивирования. Для эксперимента брались стерильные пробирки на 1,5 мл, в которые помещались в асептических условиях вегетативные клетки (0,1 мл).

Вегетативные клетки культивировали 18 часов в шейкер-инкубаторе «Innova 44» (NewBrunswickScientific, США) при 250 об./мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37 °С. Затем стерильной пипеткой отбирали 1 мл в стерильную пробирку 1,5 мл в асептических условиях помещали в центрифугу и центрифугировали их (Микроцентрифуга «MiniSpin plus») при разных условиях (воздействие

центрифугированием проводили 1, 2, 10, 15, 20 минут, при оборотах в минуту 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 14500). Затем уже процентрифугированные вегетативные клетки помещали в питательную среду. В вегетативной среде культивирование микроорганизмов проводили в шейкер-инкубаторе «Innova 44» (NewBrunswickScientific, США) при 250 об./мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37°C. После культивирования брали 1 мл и использовали метод десятикратных разведений, на шесть и семь титров с высевом на агаризованную среду. Высев проводился в стерильных условиях. Далее культивирование проводили в термостате. И уже потом проводился подсчет колоний. В качестве контрольной пробы использовали вегетативные клетки штамма *Bacillus subtilis* ВКПМ -12079 без воздействия центрифуги.

Исследования проводились в лаборатории инжинирингового центра «Промбиотех» АлтГУ.

Результаты и их обсуждение. Из проведенных исследований следует, что при центрифугировании микроорганизмы *Bacillus subtilis* испытывают депрессию, количество выживших колоний сокращается. Из рисунка 1 видно, что при центрифугировании количество выживших колоний сокращается, резкий скачок КОЕ (колониеобразующая единица) наблюдается только при центрифугировании в течение 5 минут при 6000 оборотах в минуту.

На рисунке 2 видно, что при центрифугировании при 2000 и 4000 оборотах в минуту идет подавление численности колоний. Можно предположить, что такой эффект связан с тем, что внешнего давления недостаточно, чтобы клетка начала активно сопротивляться и, следовательно, можно наблюдать депрессию. Количество колоний резко сокращается.

Известно, что клетка способна со временем приспосабливаться к агрессивным для нее условиям внешней среды. Исходя из данных, приведенных на рисунке 3, можно предположить, что 8000 и 14500 оборотов в минуту достаточно, чтобы клетка начинала активно сопротивляться. При центрифугировании в таких условиях со временем количество колоний увеличивается.

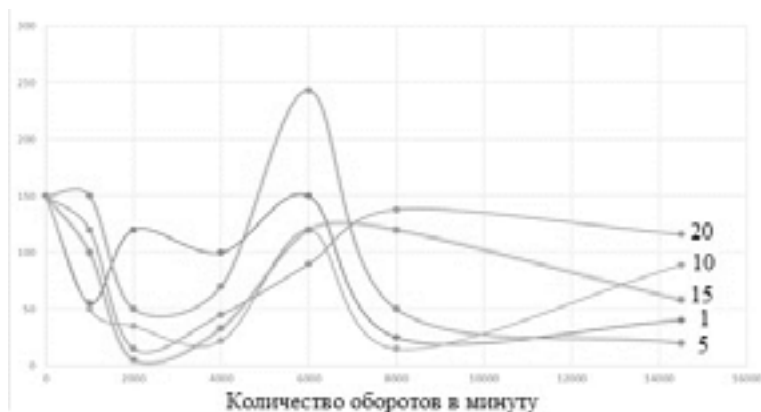


Рис. 1. Зависимость количества колоний (вегетативные клетки) от количества оборотов и времени центрифугирования

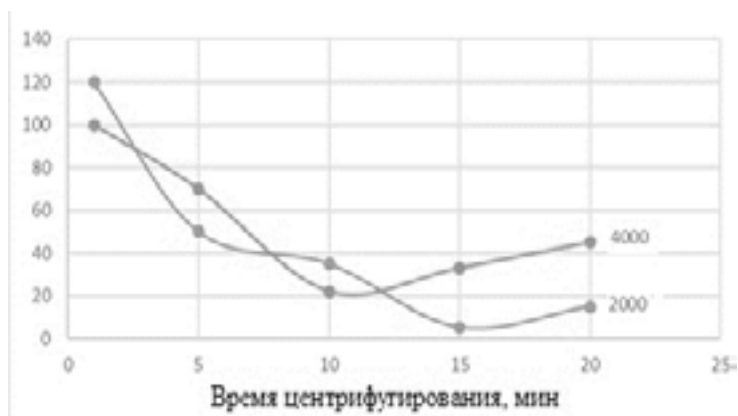


Рис. 2. Изменение численности колоний при центрифугировании при 2000 и 4000 оборотах в минуту

Из рисунка 4 так же, как из данных, приведенных на рисунке 1, следует, что при центрифугировании в течение 5 минут при 6000 оборотах в минуту, КОЕ (колониеобразующая единица) показывает самый оптимальный результат, а именно 243 колонии, что больше в 1,62 раза по сравнению с штаммом без воздействия центрифуги. Можно пред-

положить, что такой эффект связан с тем, что воздействие центрифугирования при 6000 оборотах в минуту оказывается недостаточно сильными, чтобы разрушать мембрану клетки и ее растущую клеточную стенку, но достаточными, чтобы клетка начинала сопротивляться подавляющему действию центрифугирования. Из этого следует, что данные условия центрифугирования будут оптимальными.

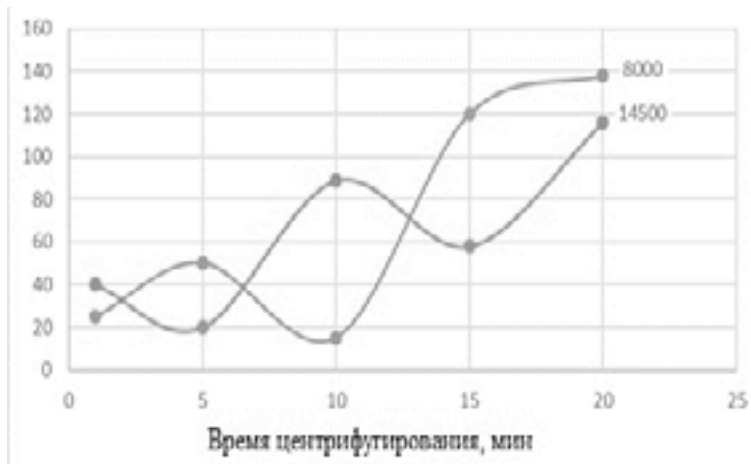


Рис. 3. Изменение численности колоний при центрифугировании при 8000 и 14500 оборотах в минуту

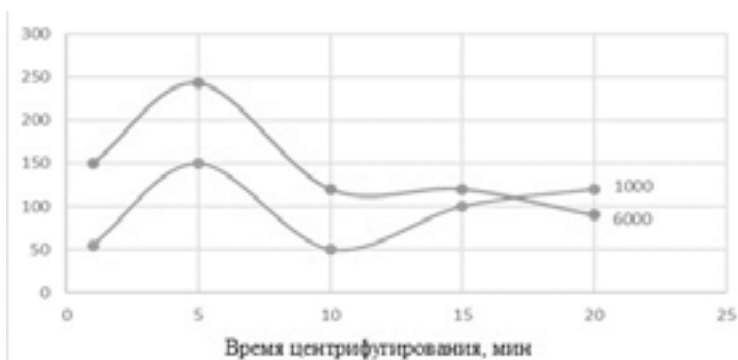


Рис. 4. Изменение численности колоний при центрифугировании при 1000 и 6000 оборотах в минуту

Таким образом, при центрифугировании микроорганизмы *Bacillus subtilis* испытывают депрессию. Количество выживших колоний сокращается. Действие центрифугирования сводится к повреждению клеток. Так как при центрифугировании *Bacillus subtilis* при высоких оборотах из-за разницы осмотического давления внутри клетки и внешнего давления, которое оказывает центрифуга, возникает сдвиг и напряжение, создаваемое центробежной силой. Как следствие, клеточная мембрана или растущая клеточная стенка рвется (Schlegel, 1985; Swetlov, 2014). Поэтому можно предположить, что центрифугирование отрицательно влияет на рост бактерий из-за разности осмотического давления внутри клетки и внешнего давления, которые оказывает центрифуга. Клетка, которая не может адаптироваться к этим условиям, погибает.

Центрифугирование как стадия технологического процесса будет негативно влиять на численность микроорганизмов. Возникающее при этом давление обладает потенциальной способностью оказывать на живые организмы разрушительное действие. Если центрифугирование как стадия процесса незаменима и необходима, то рекомендуется проводить его при 6000 оборотов в минуту, с наименьшим показателем ускорения, в течение 5 минут. Кроме того, рекомендуется заменить центрифугирование микрофильтрацией.

Выводы

1. Центрифугирование как стадия технологического процесса негативно влияет на численность вегетативных клеток *Bacillus subtilis*.
2. Негативное воздействие не наблюдается только при центрифугировании при 6000 оборотах в минуту в течение 5 минут.
3. В целом центрифугирование уменьшает выход продукта, поэтому рекомендуется заменить его микрофильтрацией.

Библиографический список

- Schlegel H.G. Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart. New York, Thieme, 1985. 567 p.
- Swetlov P. Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know // Journal of Bacteriology. 2014. Vol. 196 (7). P. 1297–1305.

УДК 60.602.3

К.А. Курилова¹, Б.П. Шипунов¹, Е.С. Яценко¹, Р.М. Яценко²¹Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)²Московский государственный технический университет (Москва, Россия)

Влияние звукового воздействия на скорость размножения *Bacillus subtilis* в процессе культивирования

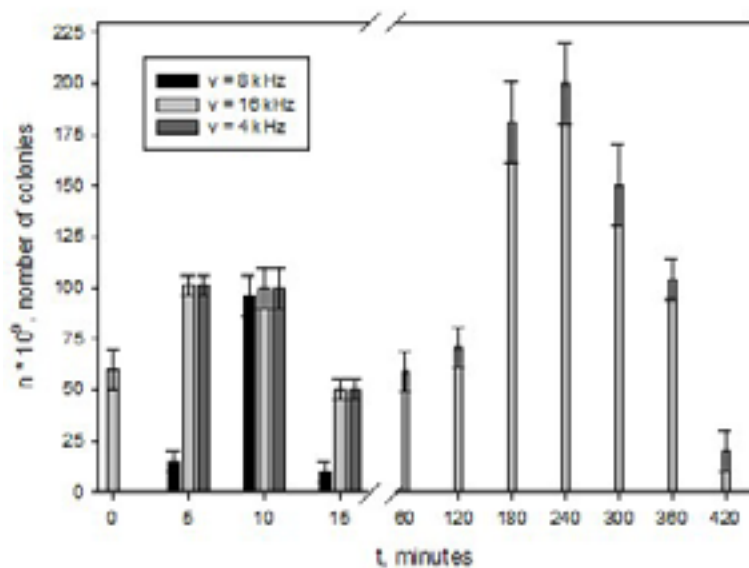
Было проведено исследование влияния звукового поля на скорость размножения бактерий *Bacillus subtilis*. Доказано, что звуковое поле влияет на скорость размножения этих бактерий, но зависимости скорости размножения от времени пребывания спор в звуковом поле не найдено. Тем не менее полученные значения подтверждают гипотезу о том, что звуковое воздействие увеличивает скорость размножения бактерий.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, скорость размножения, влияние звукового поля.

Для медицины бактерии *Bacillus subtilis* представляют большой интерес, на основе этих бактерий создано немало иммуномодуляторов. В связи с этим актуальным является развитие методов, позволяющих ускорить метаболические процессы, увеличить выход количества бактерий, не увеличивая при этом время культивирования.

Исследуемый биологический препарат представляет собой сухой порошок из лиофильно высушенных бактерий, содержание спор составляет не менее $5 \cdot 10^9$ КОЕ/г. Проводилось 3 параллельных эксперимента. Для этого было взято по $0,100 \pm 0,005$ г сухих спор *Bacillus subtilis* ВКПМ В-2896. Споры помещались в установку, где они находились под действием звуковых волн в течение определённого промежутка времени: 5, 10, 15 минут и 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 часов. Параметры звука: частота $\nu = 4 - 16$ кГц, мощность $P = 112 - 120$ дБ. Характеристики звука были измерены шумомером ШУМ-1М30 в А

диапазоне. Генератором звука служил генератор сигналов низкочастотный ГЗ-112/1 (производство СССР) с усилителем. Споры находились в эппендорфах на расстоянии 10 см от источника звука. После воздействия звука споры выдерживали в течение нескольких дней. Через 10 дней споры помещались в бульон (хлорид натрия, дрожжевой экстракт, пептон), концентрация бактерий в начальный момент времени составляла $2 \pm 0,1$ г/л. Колбы помещались в шейкер-инкубатор «Innova 44» (NewBrunswickScientific, США) (250 об/мин (эксцентриситет 5 см)) при температуре 38 °C на один день, после чего переносились на твёрдую среду – агар (хлорид натрия, дрожжевой экстракт, пептон, агар-агар). Для культивирования бактерий использовался метод кратных разведений. После этого чашки Петри с бактериями оставлялись в термостате при температуре 36 °C на 24 часа. В последний день проводился подсчёт колоний бактерий.



Зависимость числа колоний от времени, проведённом под воздействием звука с частотой $\nu = 4, 8$ и 16 кГц и мощностью $P = 112 - 120$ дБ

По итогам экспериментов было выявлено, что при воздействии на споры звуком с частотой 4 кГц, мощностью 116,4 дБ и 16 кГц, мощностью 116 ± 4 дБ увеличивается число бактерий, причём число бактериальных колоний и зависимость воздействия звука на них не коррелируют (см. рис.), но наблюдаются пики прироста бактерий в разные периоды времени. В среднем на 35% увеличивается число бактерии при воздействии на них звуком частотой 4 и 16 кГц по 5 и по 10 минут, а при воздействии на споры звуком частотой 16 кГц длительностью 2 часа число бактерий увеличивается почти в 3,5 раза.

Таким образом показано, что скорость размножения бактерий увеличивается при воздействии на них звуком, близким к ультразвуковому диапазону.

УДК 661.187

Ю.Е. Курис, А.В. Голод, А.Е. Бовина, А.В. Протопопов

*Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова (Барнаул, Россия)*

Химическая переработка растительных масел и их отходов маслоэкстракционных производств

Исследован процесс омыления подсолнечного масла и отходов их производства гидроксидом натрия. Получены поверхностно-активные вещества в виде натриевых солей жирных кислот растительных масел. Показано, что с использованием пенообразующего агента увеличивается выход солей жирных кислот в результате повышения активной поверхности растительного масла. Получены продукты с содержанием мыла до 70%. Методом ИК-спектроскопии доказано образование солей жирных кислот из растительных масел и отходов их производства.

Ключевые слова: растительные отходы, растительные масла, поверхностно-активные вещества.

К основному жировому сырью для производства мыл относятся пищевые и технические животные жиры, саломас, кокосовое, пальмоядровое и пальмовое масла, синтетические жирные кислоты, каприноил, нефтяные кислоты, дрожжевые и другие жиры.

Растительные масла, применяемые для выработки мыла, разделяют на две основные группы: твердые и жидкие.

К твердым растительным маслам относятся кокосовое, пальмоядровое и пальмовое масла. Их добавление в мыла обеспечивает создание нужной пластичности при механической обработке. Недостатком этой группы масел как сырья для туалетного мыла является содержание в них низкомолекулярных кислот, натриевые соли которых не обладают моющим действием. Это служит причиной ограниченного применения кокосового масла в рецептурах туалетных мыл.

Пальмовое масло по своему жирнокислотному составу приближается к животным жирам и является хорошим сырьем для туалетного мыла. Твердые растительные масла получают из импортного сырья, поэтому они применяются в производстве ограниченно и только при выработке туалетных мыл. Обычно их заменяют хорошо очищенными синтетическими жирными кислотами.

Жидкие растительные масла – подсолнечное и соевое – не используют для получения твердых туалетных мыл из-за наличия в них значительных количеств высоконенасыщенных жирных кислот. По этой же причине в рецептуру твердых хозяйственных мыл их вводят в количестве не более 15–30%. В то же время они пригодны для варки всех видов жидких хозяйственных и туалетных мыл, а также мазеобразных хозяйственных и промышленных мыл.

Известно, что свойства мыла, такие как пенообразование, моющая способность и пластичность, зависят от свойств использованного в производстве мыла сырья. Общеизвестно, что мыло из кокосового или пальмового масел дает стойкую и обильную пену, что обуславливает применение этих масел в промышленном мыловарении в отличие от промышленного применения отечественных растительных масел (Товбин, 1965; Селиванов, 2008).

Известен способ получения мыла низкотемпературным омылением растительных масел щелочью либо каустиком, где в качестве сырья используются легкоомыляемые масла, такие как кокосовое,

пальмовое, оливковое, касторовое, горчичное. Наиболее распространено использование кокосового, пальмового и оливкового масел, продукт омыления широко известен под общим наименованием «клеевое мыло», мыло из оливкового масла известно под наименованием «кастильское мыло» по наименованию провинции в Испании, где производством низкотемпературного клеевого мыла из оливкового масла занимались на протяжении веков (Щербаков, 1982).

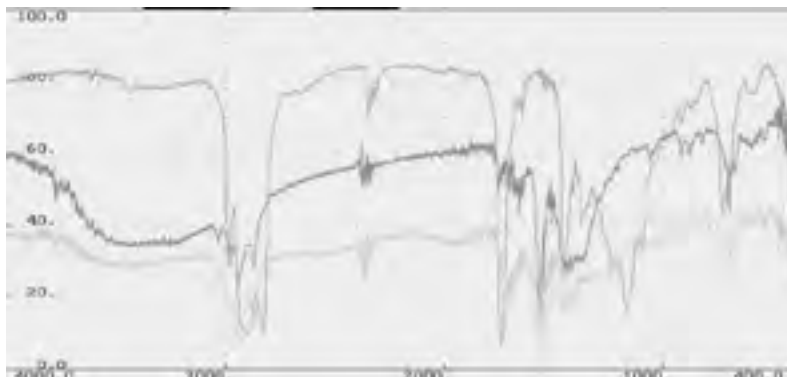
В России есть несколько производителей, получающих поверхностно-активные вещества из жирных кислот растительных масел, однако в качестве растительных масел используется импортное сырье – пальмовое и кокосовое масла. В рамках реализуемого проекта предполагается использование местного подсолнечного масла, жирнокислотный состав которого значительно отличается от тропических масел наличием, в частности, большего количества остатков непредельных высших карбоновых кислот. По ключевым физико-химическим показателям: внешний вид, амидное число, массовая доля свободных аминов и подобное – получаемые пеностабилизаторы ни в чем не уступают известным мировым аналогам. Существенным преимуществом является и их невысокая стоимость.

В ходе работы планируется разработка методики получения натриевых мыл (солей жирных кислот), амидов жирных кислот и их замещенных из местного сырья – подсолнечного и рапсового масла, а также отходов их производства – соапстоков и отбельных глин. Целью нашей работы являлось получение натриевых мыл из подсолнечного масла алтайских производителей и отходов маслоэкстракционного производства.

В ходе нашей работы было проведено взаимодействие растительного масла с концентрированным раствором щелочи при температурах от 70 до 90 °С. Полученные соли жирных кислот промывались от непрореагировавшей щелочи и высушивались на воздухе. Впоследствии методом потенциометрического титрования определяли количество полученных солей жирных кислот. Выход по отношению к растительному маслу составил от 20 до 50%. Полученные соли жирных кислот анализировали методом ИК-спектроскопии.

Анализ методом ИК-спектроскопии показал исчезновение полос поглощения в области 1750 и 1250 см⁻¹, ответственных за колебания сложноэфирной связи. При этом появляются полосы поглоще-

ния в области 1550 см^{-1} , ответственные за колебания карбонильной группы в солевой форме.



ИК-спектр исходного растительного масла и полученных солей жирных кислот

Проведенные опыты по непосредственному омылению подсолнечного масла показали низкий выход, всего до 50% мыла от исходной навески растительного масла. Процесс омыления растительного масла в данных условиях протекает в гетерогенной среде, при этом образующиеся в ходе реакции соли жирных кислот растительного масла солюбилизируют частицы масла, что замедляет скорость реакции и не позволяет увеличить выход продукта. Для повышения выхода получаемых солей жирных кислот было решено увеличить реакционную поверхность растительного масла. Для этого в растительное масло добавляли пенообразующий агент. Для определения оптимальных соотношений компонентов варьировали содержание гидроксида натрия и пенообразующего агента. Полученные продукты анализировали на содержание связанной и свободной щелочи (табл. 1). Как показывают приведенные данные, содержание мыла в полученных продуктах увеличилось практически до 70 %, что соответствует стандарту туалетного мыла. При проведении синтеза в данных условиях получается готовый мыльный продукт без образования подмыльного щелока и не требует дополнительной очистки от непрореагировавшей щелочи и, как соответствие, происходит без образования сточных вод от производства. В результате получаемое

мыло обладает белым цветом и слабым, слегка ощутимым запахом исходного нерафинированного подсолнечного масла. Полученные мыла содержат в своем составе глицерин, аминокислоты, витамины, белки и душистые вещества от исходного нерафинированного масла.

Таблица 1

Содержание связанной и свободной щелочи в продуктах омыления растительного масла

Соотношение NaOH : пенообразователь; условия синтеза	Содержание щелочи, %	
	связанная	свободная
7:0,5; 2 часа 90 °C	29,27	0,03
7:1; 2 часа 90 °C	35,79	0,02
7:1,5; 2 часа 90 °C	36,14	0,02
8:2; 2 часа 90 °C	52,07	0,34
9:2; 3 часа 80 °C	56,29	0,16
9:2; 3 часа 90 °C	64,84	0,35
10:2; 4 часа 80 °C	58,21	0,37
10:2; 4 часа 90 °C	63,46	0,29
11:2; 4 часа 80 °C	62,49	0,33
11:2; 4 часа 90 °C	68,95	0,35
12:2; 4 часа 90 °C	65,85	0,23

В аналогичных условия были проведены опыты по получению солей жирных кислот из отходов маслоэкстракционного производства. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание связанной и свободной щелочи в продуктах омыления отходов растительного масла

Соотношение NaOH : пенообразова- тель; условия синтеза	Содержание щелочи, %	
	связанная	свободная
3:1,5; 4 часа 90 °C	47,34	0,37
5:1; 4 часа 90 °C	53,33	0,52
7,5:1; 4 часа 90 °C	55,41	0,28
6:1; 6 часов 90 °C	71,57	0,16

Вследствие отличия состава отходов маслоэкстракционного производства от нерафинированного растительного масла условия их обработки отличаются и для достижения хорошего результата необходимо более высокая длительность обработки. При проведении омыления отходов получения растительного масла в течение шести часов удалось достигнуть глубины взаимодействия до 70 %. Полученные в результате процесса продукты отличаются светло-кофейным цветом и характерным запахом хозяйственного мыла (ГОСТ 790-89, 7. ГОСТ 30266-95).

Реализация проекта направлена на разработку процессов получения ПАВ – на основе природного сырья Алтайского края – растительных масел (в частности – подсолнечного и рапсового), отходов их переработки. Реализация таких технологий:

- 1) позволяет получать широкий спектр ПАВ высокого качества с различными свойствами;
- 2) приводит к возможности замещения аналогичных по свойствам импортных товаров;
- 3) приводит к снижению негативных антропогенных воздействий на окружающую среду за счет дополнительных возможностей утилизации отходов, их реализации.

Высокое качество продукции будет, в том числе, обусловлено особенностями жирнокислотного состава подсолнечного масла (а именно, высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот в составе подсолнечного масла, в отличие от тропических масел, которые преимущественно содержат насыщенные жирные кислоты).

Библиографический список

ГОСТ 30266-95 Хозяйственное мыло твердое. Общие технические условия.

ГОСТ 790-89 Испытание мыла хозяйственного и туалетного.

Купчинский П.Д., Зотова М.В., Кипоренко С.Ф. Производство хозяйственного мыла с полезными добавками. Масложировая промышленность. М., 1965. 216 с.

Селиванов С. Е., Кулик М.И. Утилизация отходов soapстоков. М., 2008. 239 с.

Товбин И. М., Залипо М. И., Журавлев Д. М. Производство мыла. М., 1965. 391 с.

Товбин И.М., Файнберг Е.Е. Технологическое проектирование жироперерабатывающих предприятий / под ред. А.Л Маркмана. М., 1965. 516 с.

Щербаков В.Г. Технология получения растительных масел. Л., 1982. 168 с.

УДК 678.073

Ю.Е. Курис, А.Н. Шлеина, Д.С. Вагина, А.В. Протопопов

*Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова (Россия, Барнаул)*

Получение новых продуктов из отходов растительного происхождения

Изучена возможность получения термопластичных водорастворимых материалов на основе отходов растительного происхождения. Полученные композиции на основе древесины и лигнина обладают высокой водопоглощающей способностью и образуют устойчивые гели на водной основе. С применением метода ИК-спектроскопии показано образование простых эфирных связей в полученных композициях на основе древесины и лигнина.

Ключевые слова: растительные отходы, термопластичные материалы, водорастворимые продукты растительного происхождения.

Полимерные натуральные материалы привлекают внимание ученых, так как их можно использовать как основу для создания новых биологически активных веществ биомедицинских применений. Материалы, полученные из природных источников, обладают высокой функциональностью и хорошими механическими свойствами.

Среди натуральных полимеров наибольший интерес представляет целлюлоза, ее уникальные свойства позволяют широко использовать на ней материалы и производные.

Одной из наиболее перспективных областей структурной или химической модификации целлюлозы является производство биологически активных материалов для использования в медицине, биотехнологии и фармацевтике. Среди целлюлозных материалов особый интерес представляют гибридные и нанокompозитные гидрогели, обладающие многообещающими функциональными свойствами (Котельникова 2017; Котельникова, 2014).

Производство многокомпонентных систем с биологически активными свойствами с использованием целлюлозы в качестве матрицы до настоящего времени проводилось в гетерогенных условиях, что приводило к трудностям в экспериментальной части и, в большинстве случаев, было дорогостоящим. Одним из способов решения этих проблем является получение целлюлозных растворов при последующем образовании гидрогелей из растворов осаждением, рефлюксом и другими. В гораздо менее развитой области, основанной на прямом растворении целлюлозы в немодифицированных различных системах растворителей, это связано с тем, что целлюлоза растворяется в ограниченном количестве растворителей (Rui Chen, 2012).

Значительный объем опубликованных работ, посвященных растворению целлюлозы в различных растворителях и использованию растворов для модификации целлюлозы или получения композитов на их основе, привел к дальнейшим исследованиям в этом направлении, в результате чего были найдены новые системы растворения. Однако большинство из них не нашли практического применения по различным причинам, включая ограниченную растворимость, токсичность и экологический ущерб (Riccardo, 2009; Berger, 2004).

Целью нашей работы являлось получение термопластичных композиционных материалов из отходов растительного происхождения, в частности древесных опилок и лигнина. В ходе нашей работы мы проводили взаимодействие опилок древесины осины или сульфатного лигнина с ПВС.

Сырьем в нашей работе был сульфатный лигнин производства Архангельского ЦБК. Также использовали древесину осины фракцией от 0,3 мм.

Древесину и лигнин предварительно активировали в растворе щелочи. Активация происходит в результате мерсеризации растительного сырья и состоит из смешения для достижения относительной однородности и постоянства свойств направляемого на взаимодействие растительного продукта с ПВС. Раствор щелочи брали концентрацией 5, 10, 15, 20% при температуре 70 –90 °С, набухание происходило в течение часа.

После добавляли навеску ПВС и проводили взаимодействие в течение трех часов при той же температуре. Полученные образцы промывали ацетоном и сушили до воздушно сухого состояния. Исходные данные для проводимого синтеза показаны в таблицах 1, 2.

Таблица 1

Соотношение компонентов и условия проведения синтеза
с древесиной

№ об- раз- ца	Масса дре- весины, г	Концен- трация NaOH, %	Темпе- ратура, °С	Масса ПВС, г	Время на- бухания, мин	Общее время синтеза
1	3	20	70	3	60	240
2	3	20	90	3		
3	3	10	70	3		
4	3	10	90	3		
5	3	5	70	3		
6	3	5	90	3		

Полученные продукты очищали от избытка щелочи ацетоном. При высаживании в ацетон образовывался гель, который был устойчивым и расслаивался от ацетона. Данный факт позволяет сделать заключение об образовании химических связей между ПВС и древесиной или лигнином и получением продуктов с высокой гидрофильностью.

Таблица 2

Соотношение компонентов и условия проведения синтеза
с лигнином

№ образца	Масса лигнина, г	Концентрация NaOH, %	Температура, °С	Масса ПВС, г	Время набухания лигнина, мин	Общее время синтеза, мин
1	3	20	70	3	60	240
2	3	20	90	3		
3	3	10	70	3		
4	3	10	90	3		
5	3	15	70	3		
6	3	15	90	3		

В дальнейшем было проведено определение влагопоглощения по ГОСТ 56762 – 2015.

В течение 54 дней были проведены исследования на влагопоглощение образцов, результаты показаны на графиках 1, 2 для древесины осины и лигнина соответственно.

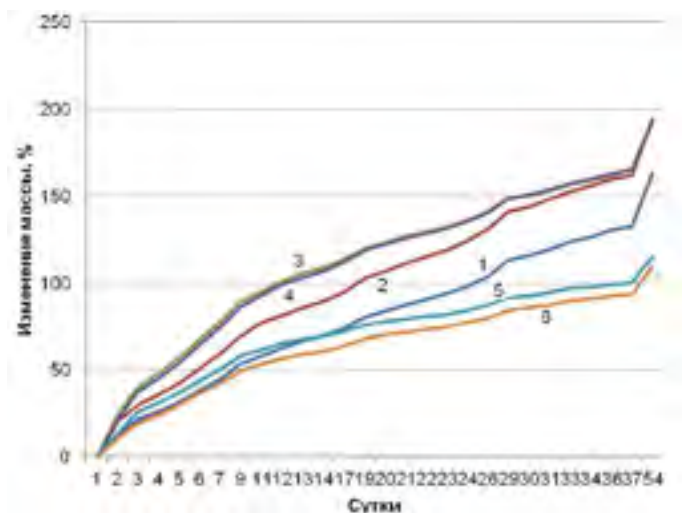


Рис. 1. Изменение массы продуктов на основе древесины осины в ходе влагопоглощения

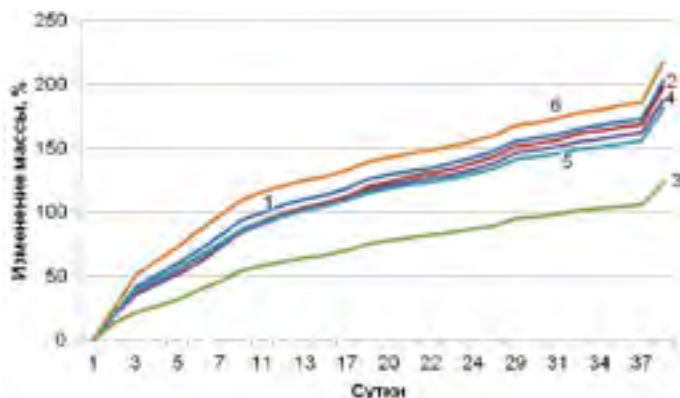


Рис. 2. Изменение массы продуктов на основе лигнина в ходе влагопоглощения

Все полученные продукты характеризуются высокой влагопоглощающей способностью. По истечении двух месяцев образцы продолжают набирать влагу, высушенные предварительно до абсолютно сухого состояния продукты после сорбции влаги образуют устойчивый гель.

По влагопоглощению образцов из древесины можно сделать заключение, что при концентрации щелочи в процессе обработки древесного сырья наблюдаются самые высокие значения влагопоглощения (10%). Это может быть связано с оптимальным соотношением между прореагировавшими и свободными гидроксильными группами. Наименьшее значение влагопоглощения имеют образцы с концентрацией щелочи 5% при обработке исходного сырья. Структура древесины в данном случае осталась практически неизменной. В результате гелеобразования получается однородный продукт, без каких-либо включений, в отличие от образцов, полученных обработкой 5% щелочью.

В случае с образцами из лигнина наибольшее значение влагопоглощения наблюдается у образцов, полученных после обработки 20% раствором щелочи и 15% при 90 °С. Очевидно, что гидрофильные свойства полученного композита увеличиваются при возрастании степени взаимодействия между лигнином и ПВС. Выводы о влагопоглощении и связи со степенью взаимодействия подтверждаются с помощью ИК-спектроскопии.

Термопластичность была проверена с использованием сушильного шкафа. Температурный интервал подбирается таким образом, чтобы исключить нежелательные сшивки и возникновение термической деструкции. При повышении температуры на 10 °С каждые 10 минут образцы проверялись на изменение термопластических свойств. Определяя термопластичность, при температуре около 100 °С, образцы начинали размягчаться, а при 150 °С происходило разложение продуктов.

Для изучения на произошедшие в процессе химической модификации превращения проведен анализ методом ИК-спектроскопии, полученные спектры представлены в приложении Б. Исследования проводились на спектрофотометре ИКС-40 методом суспензионного таблетирования в бромиде калия. Интерпретацию спектров проводили с использованием справочных данных. После проведения взаимодействия для продуктов из древесины наблюдается увеличение интенсивности для полос поглощения 1050–1100 см^{-1} , характерных для колебаний простой эфирной группы, а также наблюдается уменьшение интенсивности для полос поглощения в области 3600 см^{-1} , отвечающих за колебания гидроксильных групп. Аналогичная картина наблюдается и для продуктов взаимодействия с лигнином.

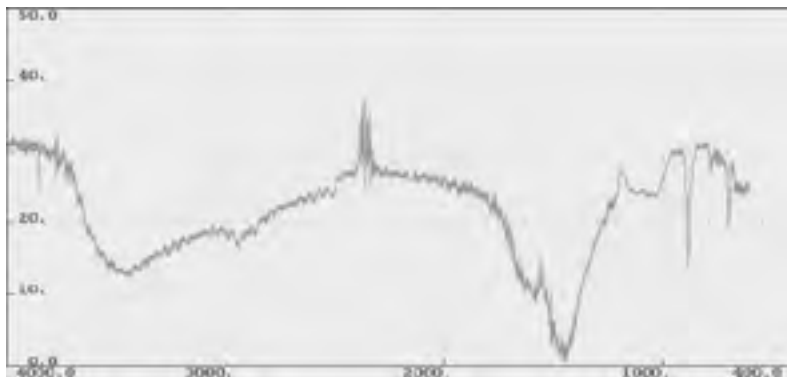


Рис. 3. ИК-спектр лигнина с ПВС при температуре 90 °С

Так как полученные продукты имеют плохую растворимость в доступных растворителях, то используется метод горячего прессо-

вания исследуемых образцов с добавлением парафина. Полученные плитки прессовались при температуре 110 °С, продолжительность цикла 5 мин, под давлением 10 т. Полученные образцы композиционных материалов представляют собой твердые пластины, проявляющие эластичные свойства на изгиб. После прессования все образцы сохранили гидрофильные свойства и при смачивании начинают растворяться.

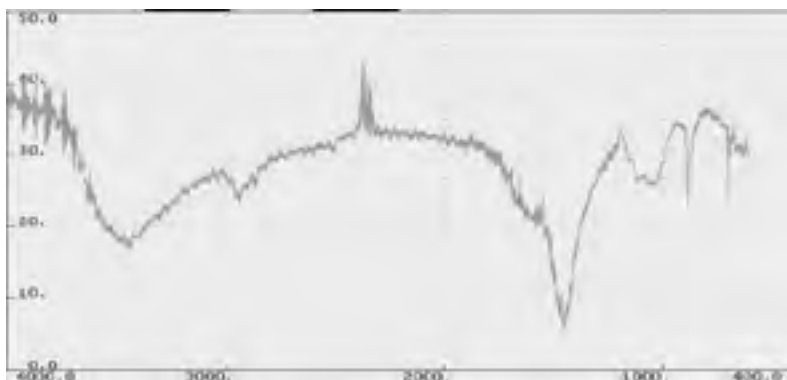


Рис. 4. ИК-спектр древесины с ПВС при температуре 90 °С

В последнее время отношение к дереву изменилось. Малоценной древесины нет – есть ценная, особенно плотная, медленно растущая древесина северных широт. В результате этого на сегодняшний день весьма актуальными стали технологии, которые позволяют практически полностью использовать отходы деревообработки, заменить натуральную древесину на искусственную, которая не уступает ей по качеству.

В ходе работы был получен древесно полимерный композит. Исследования древесины осины и лигнина на влагопоглощение и термопластичность показали, что все образцы имеют хорошие характеристики, что позволяет их использование во многих отраслях промышленности.

Библиографический список

Котельникова Н.Е., Михаилиди А.М., Мартакова Ю.В. и др. Растворы лигноцеллюлоз в ДМАА/LiCl и свойства самоорганизующихся био-

материалов из растворов // Известия вузов. Технология легкой промышленности. 2014. № 4. С. 41–47.

Котельникова Н.Е., Михаилиди А.М., Мартакова Ю.В. Получение целлюлозных гидрогелей при самоорганизации из растворов целлюлозы в ДМАА/LiCl и их свойства // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2017. Т. 59, № 1. С. 63–75.

Berger J., Reista M., Mayer J.M. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2004. N 57. P. 19–34.

Riccardo A.A. Muzzarelli. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids // Carbohydr. Polym. 2009. N 77. P. 1–9.

Rui Chen, Qi Chen, Da Huo et al. In situ formation of chitosan–gold hybrid hydrogel and its application for drug delivery // Coll. Surf. B: Biointerfaces. 2012. N 97. P. 132–137.

УДК 579.67

В.А. Логинов¹, А.А. Майоров²

¹Белебеевский молочный комбинат (Белебей, Башкортостан, Россия)

²Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий (Барнаул, Россия)

Технологические режимы выработки сыров в межсезонные периоды года

Рассмотрены технологические режимы выработки сыров в межсезонные периоды года.

Ключевые слова: сыры, состав молока, технологический режим, сезоны года.

Состав и качество молока, поступающего на выработку молочных продуктов, и в частности сыра, изменяется под влиянием сезо-

нов года. Наибольшее количество сухих веществ содержит молоко осеннего периода, наименьшее – весеннего. В среднем эти различия составили 0,62%. В основном они складывались из колебаний в содержании жира и белка. По массовой доле жира различия между максимальным и минимальным значениями по периодам года составили 0,28%, по белку – 0,26%. Изменения по массовой доле жира и белка в молоке наблюдали и у отдельных поставщиков. Как правило, наиболее высокие показатели по содержанию жира и белка имело молоко осеннего периода. В целом, вариации этих значений для жира находились в пределах от 3,36 до 4,39%, для белка – от 3,0 до 3,50%. Изменения в составе поступающего молока требуют коррекции подготовки молока и коррекции технологических режимов непосредственно производства сыра. Анализ данных состава молока указывают на большие резервы, имеющиеся у животноводов по улучшению этих показателей. Находясь в одинаковых климатических условиях, различные хозяйства получают молоко с разными массовыми долями жира и белка. В первую очередь это связано с рационами кормления коров, условиями их содержания, а также с породными и генетическими особенностями животных (Шилер, 1984; Гудков, 2003).

Физико-химические показатели и показатели технологических свойств молока по периодам года приведены в таблице 1.

Таблица 1

Физико-химические свойства молока по периодам года

Наименование показателя	Физико-химические показатели и технологические свойства молока по периодам года			
	Весенний	Летний	Осенний	Зимний
Плотность, кг/м ³	1028,3	1029,0	1029,4	1029,2
Титруемая кислотность, оТ	17,0+0,2	18,5+0,2	18,0+0,2	18,0+0,2
Активная кислотность, рН	6,6+0,1	6,5+0,1	6,5+0,1	6,6+0,1
Продолжительность свертывания, мин	37+3	26+2	25+2	27+1
Отделение сыворотки, % от массы	72,3+1,3	78,6+1,4	77,3+1,2	76,8+0,9

В таблице 2 приведен химический состав молока, полученного в различные периоды года. Наиболее значимые отличия в молоке, полученном в различные периоды года, наблюдались в отношении способности свертывания сычужным ферментом, а также в отношении способности получаемых стустков к синергетическому отделению сыворотки (Остроумов и др., 2001).

Таблица 2

Химический состав молока по периодам года, %

Наименование	Весенний	Летний	Осенний	Зимний	За год
Вода	87,72	87,64	87,32	87,52	87,55
Сухие вещества	12,28	12,36	12,68	12,48	12,45
Жир	3,63	3,76	3,91	3,81	3,78
Белок	3,07	3,20	3,33	3,24	3,21
Углеводы	4,86	4,70	4,73	4,71	4,75
Минеральные в-ва	0,72	0,70	0,71	0,72	0,71
Соотношение жир/белок	1,18	1,18	1,17	1,18	1,18

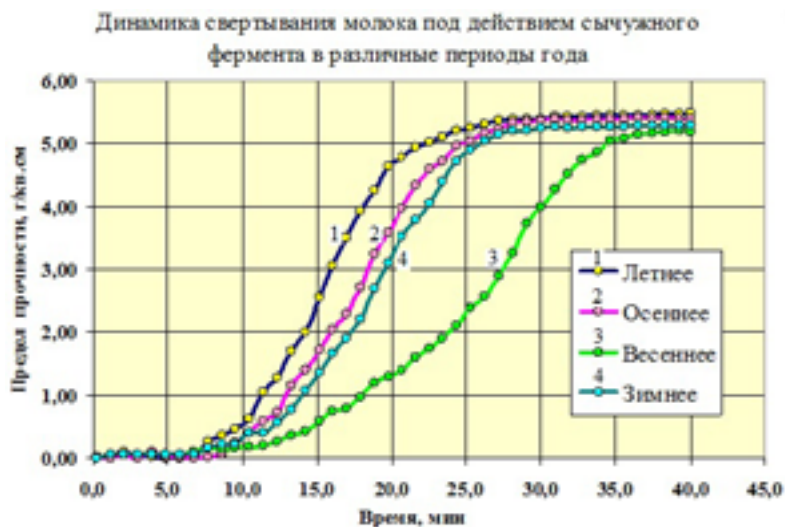


Рис. 1. Динамика свертывания молока по периодам года

Хуже всего на сычужный фермент реагировало молоко весеннего периода. Продолжительность его свертывания составляла в среднем 37 мин. В остальные периоды года сычужная свертываемость молока улучшалась. В летний период продолжительность свертывания составляла в среднем 25 мин, в зимний период – 27 мин. Кроме того, сгусток, полученный из молока весеннего периода, медленнее выделял сыворотку, а в ее составе содержалось больше сухих веществ (на 5,5%) и жира (на 37,5%) по сравнению с молоком летнего периода. Динамика свертывания молока различных периодов года приведена на рисунке 1. Эксперименты проводили на специальной установке Сибирского НИИ сыроделия, позволяющей одновременно получать данные по пяти образцам молока.

Для повышения содержания и поддержания белка на требуемом уровне в любое время года, вне зависимости от сезона, рекомендуется применять в производстве ультрафильтрацию. Она позволяет увеличить массовую долю белка в молоке, до того уровня, который необходим для оптимального технологического процесса. К примеру, на Белебеевском молочном комбинате в ходе практических испытаний пришли к общему мнению, что для нормального функционирования сыродельного производства вполне достаточно обеспечивать массовую долю белка в нормализованном молоке на уровне 3,4%, не более. В принципе, применение мембранных методов позволяет поднять белок до 14%, но в молоке для производства сыров это лишнее. В данном случае подходит установка ультрафильтрации «холодного» типа для обезжиренного молока. При этом обезжиренное холодное молоко с температурой 7–8 °С набирают в отдельную емкость. Обрат проходит через установку ультрафильтрации, а содержание белка в нем увеличивается до 9%. Далее, белковый концентрат накапливают в емкости и при необходимости порционно добавляют в нормализованную по жиру смесь, доводя массовую долю белка до требуемого уровня – 3,4%. Пермеат, полученный в процессе концентрирования обезжиренного молока, в свою очередь, из установки ультрафильтрации поступает непосредственно в цех переработки сыворотки и смешивается с подсырной сывороткой, дальнейшая переработка которой происходит по стандартной технологии. Есть мнение, что ультрафильтрация молока может некорректно влиять

на процесс обработки сырного зерна в сыроизготовителе, так как во время коагуляции сывороточные белки могут перейти в сырное зерно, что повлияет на процесс обработки и может дать «горечь» в готовом продукте, но это не так. Здесь необходимо четко соблюдать режимы пастеризации и не поднимать температуру выше 76 °С, тогда сывороточные белки уходят в сыворотку, а жир из сыворотки практически полностью перейдет в сырное зерно, что тоже немаловажно.

С целью выявления влияния сезонных изменений состава и свойств молока на формирование качества сыра «Бельфор» проводили опытные выработки сыра из молока одних и тех же поставщиков во все периоды года.

При стабилизации технологических показателей выработки сыров состав и свойства молока повлияли на продолжительность отдельных технологических процессов.

Наибольшие отличия обнаружены при переработке молока весеннего периода. В сравнении с молоком летнего периода продолжительность его свертывания увеличилась в 1,4 раза, продолжительность обработки сырного зерна – в 1,3, продолжительность обработки зерна после второго нагревания – в 1,2 раза. Временные показатели свертывания и обработки сырного зерна для молока осеннего и зимнего периодов были близки к показателям летнего молока. Сыры, выработанные в весенний период, содержали повышенное количество влаги и соли, а также имели пониженное значение величины активной кислотности. Существенные различия обнаружены также в органолептических показателях опытных сыров. В значительной степени влияние состава и свойств молока сказалось на сырах, выработанных в весенний и зимний периоды.

Самую высокую балльную оценку получили сыры, выработанные в летний период. В среднем она составила 94,5 балла, в том числе: за вкус и запах – 41,5, консистенцию – 24,0. Основная масса сыров этого периода характеризовалась хорошо выраженным сырным вкусом и запахом с наличием легкой пряности; пластичной консистенцией; наиболее близкими по органолептическим показателям к летним сырам оказались сыры осеннего периода. Их общая оценка составила в среднем 92,5 балла, в том числе: за вкус и запах – 40,5, консистенцию – 23,5.

Ухудшение качественных показателей отмечено у сыров, выработанных в зимний период. Вкус и запах продукта стал менее выражен, в нем отмечено наличие кормового привкуса. Средняя балльная оценка вкуса и запаха составила 38,5 баллов (понижение против оценки вкуса и запаха летних сыров на 3,0 балла). Средняя оценка консистенции снизилась на 2,0 балла. Наиболее низкие органолептические показатели имели сыры, выработанные в весенний период. Они отличались кислым и горьким вкусом (средняя оценка 37,0 баллов), колющейся, мажущейся консистенцией (средняя оценка 19 баллов). Общая оценка весенних сыров понизилась в сравнении с оценкой летних сыров на 16,5 баллов, в том числе за вкус и запах – на 5,0, консистенцию – на 5,0 баллов.

С целью исправления выявленных недостатков проводили специальные выработки сыров с корректировкой некоторых параметров технологического процесса (Гудков, 2003; Остроумов и др., 2001).

При проведении выработок изменению подлежали следующие режимы: созревание молока проводили при температуре 10 ± 2 °C в течение 11 ± 1 часов. Для более сильного подавления остаточной микрофлоры температуру пастеризации молока увеличивали до 76 ± 2 °C при длительности выдержки 17 ± 1 сек. Дозу хлористого кальция увеличили на 30% по сравнению с ранее применяемыми дозами. Температуру свертывания увеличивали на два градуса Цельсия, дозу молокосвертывающего фермента (СГ-50) – на 15% (2,9 г/100 кг смеси). Проводили более интенсивную промывку сырного зерна по окончании второго нагревания (Кузнецов и др., 2003).

Увеличение дозы хлористого кальция на 30% способствовало сокращению продолжительности процесса свертывания, позволяло получать более плотный сгусток, при разрезке которого не образовалось большого количества мелких частиц белка.

Повышение температуры свертывания до 31 °C и увеличение дозы молокосвертывающего фермента привели к улучшению процесса сычужного свертывания молока и получению более плотного сгустка с хорошей синергетической способностью. Внесение 15% воды после отлива 30% сыворотки позволило нормализовать молочнокислый процесс.

Коррекция технологии повлияла на состав и свойства полученного сыра. В опытных сырах вкус и запах стали менее кислыми, в них появился более выраженный сырный вкус. Консистенция стала более плотной, с меньшим содержанием влаги, но достаточно пластичной.

Повышение общей органолептической оценки сыров опытных вариантов в сравнении с сырами контрольных вариантов составило 9,0 баллов, в том числе: за вкус и запах – 2,0, консистенцию – 3, рисунок – 4 балла.

Проведенные опытные выработки показали, что корректировка технологических режимов позволяет стабилизировать качество производимого сыра, вырабатываемого в периоды изменений в составе и свойствах молока, вызванных отклонениями в рационах кормления и условиях содержания коров.

Библиографический список

Гудков А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. М., 2003. 800 с.

Кузнецов В.В., Шилер Г.Г. Справочник технолога молочного производства. Технология и рецептуры. Т. 3: Сыры / под общ. ред. Г.Г. Шилера. СПб., 2003. 512 с.

Остроумов Л.А., Брагинский В.И., Осинцев А.М. Структура и коагуляционные свойства белков молока // Хранение и переработка сельхозсырья. 2001. №8. С. 43.

Шилер Г.Г. Технология сыра : справочник. М., 1984. 312 с.

УДК 664.641.122:635.8

Е.А. Машенская, М.Н. Вишняк

*Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова (Барнаул, Россия)*

Влияние порошка древесных грибов на хлебопекарные свойства муки и структурно-механические свойства теста

Современные тенденции формирования здорового рациона питания диктуют необходимость создания продуктов с повышенной биологической, физиологической и пищевой ценностью, обогащенных растительными и биологически активными добавками. В качестве функциональной добавки к хлебобулочным изделиям рассмотрена возможность использования порошка древесных грибов, произрастающих и культивируемых в Алтайском крае для придания продуктам питания функциональных и лечебно-профилактических свойств. Приведены результаты экспериментального исследования влияния добавки в виде порошка грибов «А» и «Б» на хлебопекарные свойства пшеничной муки первого сорта и структурно-механические свойства теста. Экспериментально получена рациональная дозировка порошка древесных грибов для создания рецептуры теста с грибами для производства хлеба из пшеничной муки первого сорта. Наилучшие показатели были получены при дозировке добавки порошка грибов «А» и «Б» в количестве 3%. Применение добавки порошка древесных грибов в составе теста для производства хлебобулочных изделий позволило получить новый продукт питания высокого качества, с улучшенными органолептическими показателями, функциональными и лечебно-профилактическими свойствами и сохраняющим неизменными указанные свойства в процессе хранения.

Ключевые слова: порошок, древесные грибы, пшеничная мука, свойства, тесто, клейковина, газообразующая способность, хлебобулочные изделия, добавка, функциональный, продукт, лечебно-профилактическое питание.

Наблюдаемое в последние годы глобальное ухудшение экологической обстановки, повышение уровня заболеваемости населения ставит задачу оздоровления населения за счет введения в рацион его питания достаточного количества питательных веществ, минералов и витаминов.

Пищевой статус и структура питания населения относятся к числу основных факторов, определяющих уровень развития страны и продолжительность жизни её граждан (Функциональные пищевые продукты, 2009).

Для жителей Сибирского региона проблема сбалансированного питания в течение всего календарного года стоит очень остро, так как в зимний период года обеспечить полноценное питание населения сложно.

В хлебопекарной промышленности накоплен опыт по обогащению хлебобулочных изделий биологически активными ингредиентами различного происхождения. Большой вклад в развитие данной отрасли внесли Л.Я. Ауэрман, В.И. Дробот, Л.И. Казанская, С.Я. Корячкина, Н.М. Дерканосова, Л.П. Пашенко, Л.И. Пучкова, Т.Н. Иванова, Ю.Ф. Рослякова, Т.В. Санина, Т.Б. Цыганова, Р.С. Музалевская, Н.А. Батурина и другие исследователи. Однако проблему создания ассортимента хлеба и хлебо-булочных изделий (ХБИ) функционального и лечебно-профилактического назначения нельзя считать полностью решенной (Косован, 2005).

Перспективным направлением решения задачи расширения ассортимента ХБИ для диетического и лечебно-профилактического питания является создание рецептур и технологий ХБИ, обогащенных биологически активными добавками (БАД), представляющими собой витаминно-минеральные полисахаридные комплексы, полученные из растительного сырья. В связи с этим разработка рецептуры с внесением добавок, полученных на основе растительного сырья, является актуальной.

Одним из путей реализации задач по созданию отечественного ассортимента ХБИ для профилактического питания является использование натуральных ингредиентов, повышающих содержание комплекса биологически активных веществ, недостаток которых затрудняет полноценное использование основных пищевых нутриентов (Жамукова, 2006).

Основным приемом в создании продуктов профилактической и функциональной направленности является поиск и внедрение в производство нетрадиционных растительных добавок, обладающих технологической и физиологической функциональностью (Филлипова и др., 2014). Каждая растительная добавка характеризуется индивидуальными свойствами, которые в отношении определенных заболеваний оказывают лечебно-профилактический эффект (Каяцкая, Бердина, 2014).

Целесообразность применения натурального сырья обусловлено длительным процессом брожения полуфабрикатов с участием ферментного комплекса муки и другого сырья, тепловой обработке при выпечке, которые позволяют перевести эти добавки в форму, легко усвояемую организмом человека (Жамукова, 2006). Функциональное и лечебно-профилактическое питание повышает антиоксидационную функцию отдельных органов и систем организма – печени, легких, кожи, почек и др., способствует улучшению состояния рогового слоя кожи и функции сальных и потовых желез, слизистых оболочек верхних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, повышению общей сопротивляемости организма и его адаптационных резервов (Могильный, 2009).

Для успешного решения проблемы обеспечения населения продуктами питания функционального назначения особый интерес представляет использование растительных компонентов в виде добавок к хлебобулочным изделиям (ХБИ), а именно дикорастущих и культивируемых древесных грибов. Алтайский край находится в зоне повышенного радиационного загрязнения. Известно, что древесные грибы обладают выраженными радиопротекторными свойствами. Эти свойства обусловлены уникальным химическим составом этих грибов, содержанием биологически активных полисахаридов, которые способствуют выведению радиоактивных веществ из организма человека, при этом сами древесные грибы не накапливают радионуклиды в количествах, превышающих допустимый уровень. Эти грибы содержат в составе все необходимые, с точки зрения физиологии питания, компоненты: белковые вещества, витамины, биофлавоноиды, пищевые волокна, макро- и микроэлементы.

В связи с этим применение древесных грибов и продуктов их переработки имеет уникальное значение для использования в качестве добавки в ХБИ и другие продукты питания (ПП), что является актуальным особенно для регионов с повышенным радиоактивным фоном.

Использование продуктов переработки грибов в Российской Федерации осуществляется на основании СанПиН 2.3.2.1290-03 «Гигиенические требования к организации производства и оборота биологически активных добавок к пище: Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы». В соответствии с этим документом использование продуктов переработки грибов не должно ухудшать органолептические свойства продукта, а также снижать его пищевую ценность (Власова, 2011).

Экспериментальное исследование проводилось на базе лаборатории кафедры технологии хранения и переработки зерна ИнБиоХим и Испытательного центра пищевых продуктов и сырья Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова в 2016–2017 гг. (Еремина, 2005; ГОСТ 27839-2013, ГОСТ 27669-88).

Грибы «А» и «Б» высушивали при температуре 80–85 °С до влажности 10–12%, затем измельчали до размеров частиц 0,5–1,0 мкм и дважды просеивали через капроновые сита.

Для изучения влияния порошка древесных грибов (ПГ) «А» и «Б» на хлебопекарные свойства муки порошок вносили при замесе теста взамен пшеничной муки в количестве 2, 3, 4, 5, 6 и 7% от ее массы. Для исследования влияния добавки в виде ПГ «А» и «Б» на хлебопекарные свойства пшеничной муки 1-го сорта использовали две пробы муки, отличающиеся низкой упругостью клейковины и низкой газообразующей способностью. Влияние внесения ПГ «А» и «Б» на «силу» пшеничной муки оценивали по изменению упругости клейковины.

Выявлено, что добавка ПГ «А» и «Б» оказывает укрепляющее воздействие, причем с увеличением дозировки порошка это воздействие увеличивается. Укрепление клейковины объясняется образованием гликопротеинов из молекул белков муки и молекул углеводов, входящих в состав добавки, что приводит к возникновению в молекулах белков дополнительных связей, укрепляю-

щих их структуру. Высокая эффективность укрепления муки при внесении добавки объясняется высоким содержанием в добавках моно-, поли- и дисахаридов, участвующих в образовании гликопротеинов.

На следующем этапе изучали влияние дозировок добавки ПГ «А» и «Б» на хлебопекарные свойства пшеничной муки и структурно-механические свойства теста. Для этого дозировку ПГ «А» и «Б» варьировали в интервале от 2 до 7% к массе муки. В качестве контрольного образца служило тесто без внесения добавки (табл. 1, 2). Из данных таблиц видно, что внесение добавки приводит к укреплению клейковины муки, повышает ее упругость и эластичность теста, при этом лучшие результаты были получены при дозировке добавки ПГ «А» и «Б» 3% к массе муки.

Таблица 1

Влияние дозировок порошка гриба «А» на хлебопекарные свойства пшеничной муки первого сорта

Наименование показателя	Проба муки	Значение показателя						
		Контроль КО	Дозировка ПГ «А», % к массе муки					
			1	2	3	4	5	6
Содержание клейковины, %	1	27,5	28,00	28,30	28,30	28,4	28,4	28,4
	2	26,7	27,30	27,70	27,60	28,00	28,00	28,00
Растяжимость, см	1	20	13	13	12	11	10	10
	2	22	14	14	11	12	11	11
Упругость клейковины, ед. прибора ИДК-1	1	100	69	70	68	68	62	62
	2	115	72	73	65	65	60	60
Глубина погружения К20, ед. пенетromетра	1	220	175	170	165	160	162	160
	2	240	180	175	173	170	170	170

Таблица 2

Влияние дозировок порошка гриба «Б» на хлебопекарные свойства пшеничной муки первого сорта

Наименование показателя	Проба муки	Значение показателя						
		Контроль КО	Дозировка ПГ «Б», % к массе муки					
			1	2	3	4	5	6
Содержание клейковины, %	1	27,5	28,00	28,20	28,20	28,2	28,1	28,00
	2	26,7	27,30	27,9	27,8	27,7	27,7	27,20
Растяжимость, см	1	20	12	13	13	11	10	10
	2	22	11	14	14	12	11	11
Упругость клейковины, ед. прибора ИДК-1	1	100	70	70	67	64	60	60
	2	115	74	72	65	61	60	60
Глубина погружения К20, ед. пенетрометра	1	220	175	176	172	170	170	170
	2	240	180	182	170	168	168	168

Внесение ПГ «А» и «Б» привело к незначительному снижению общего выхода сырой клейковины, но в то же время способствовало её укреплению. Исследования влияния ПГ «А» и «Б» на качество клейковины муки пшеничной хлебопекарной высшего сорта показало, что дозировки 2, 4, 5, 6 и 7 % не оказали существенного влияния на цвет и растяжимость клейковины. Внесение 5% грибного порошка изменило цвет клейковины до светло-коричневого (ПГ «А») и светло-серого (ПГ «Б») и привело к снижению растяжимости клейковины.

Таблица 3

Влияние добавки порошка гриба «А»
на структурно-механические свойства теста

Наименование показателя	Проба муки	Значение показателя						
		Контроль КО	Дозировка ПГ «А», % к массе муки					
			1	2	3	4	5	6
Показатель пене- трометра К60, ед. прибора	1	210	175	176	172	170	170	160
	2	235	180	182	170	168	168	168
Показатель фари- нографа, водо- поглощительная способность, %	1	54	70	75	74	72	72	70
	2	45	68	72	70	68	68	67
Время образова- ния и устойчиво- сти теста, мин	1	8,0	9,0	9,5	9,5	9,4	9,4	9,4
	2	7,4	8,8	9,0	9,0	8,8	8,9	9,0
Разжижение те- ста, ед. прибора	1	170	158	155	150	148	145	145
	2	180	165	158	153	150	150	150
Валориметриче- ская оценка, ед. фаринографа	1	60	70	74	73	73	73	73
	2	50	68	71	72	72	72	72

Улучшение структурно-механических свойств теста можно объяснить высокой водопоглощительной способностью белков и пищевых волокон, содержащихся в добавке ПГ «А» и «Б». Учитывая, что в добавке ПГ «А» и «Б» высокое содержание моносахаридов, дисахаридов, полисахаридов, минеральных веществ, оказывающих влияние на газообразующую способность пшеничной муки, целесообразно было исследовать влияние добавки ПГ «А» и «Б» на изменение этого показателя (см. рис.).

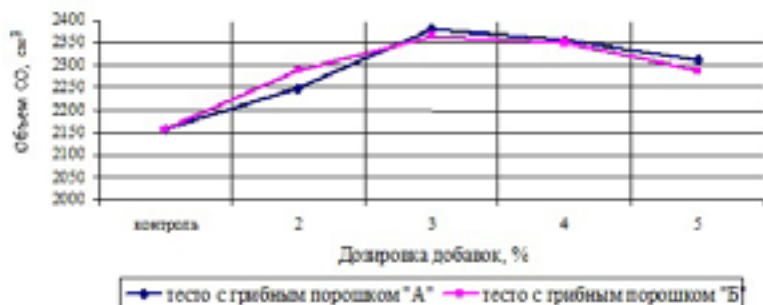
Таблица 4

Влияние добавки порошка гриба «Б» на структурно-механические свойства теста

Наименование показателя	Проба муки	Значение показателя						
		Конт-роль 1	Дозировка ПГ «Б», % к массе муки					
			2	3	4	5	6	7
Показатель пене-трома K60, ед. прибора	1	210	174	175	163	160	160	160
	2	235	182	180	174	175	175	175
Показатель фари-нографа, водо-поглотительная способность, %	1	54	66	72	76	75	76	76
	2	45	62	68	73	72	73	73
Время образова-ния и устойчиво-сти теста, мин	1	8,0	9,0	9,2	9,4	9,4	9,5	9,5
	2	7,4	8,7	8,8	9,3	9,2	9,3	9,3
Разжижение те-ста, ед. прибора	1	170	158	155	153	145	145	145
	2	180	165	158	154	150	150	150
Валориметриче-ская оценка, ед. фаринографа	1	60	70	74	77	78	78	78
	2	50	68	71	74	75	75	75

Для исследования газообразующей способности теста с добавлением ПГ «А» и «Б» в количестве 2, 3, 4 и 5% к массе муки готовили тесто безопарным способом (см. рис.). Определение проводили через каждый час брожения теста в течение 5 часов. Установлено, что при внесении ПГ «А» и «Б» газообразующая способность увеличивается. Полученные результаты исследования можно объяснить тем, что с внесением ПГ «А» и «Б» в тесто поступает дополнительное питание для дрожжевых клеток: сахара, минеральные вещества, витамины, аминокислоты, органические кислоты, оказывающие

стимулирующее действие на размножение дрожжей и их бродительную активность.



Влияние ПГ «А» и «Б» на газообразующую способность пшеничной муки первого сорта

Внесение грибного порошка приводит к росту показателя «числа падения». Увеличение доли сахаров, минеральных веществ и витаминов за счет вносимой добавки положительно влияет на подъемную силу дрожжей. Внесение 2 и 3% дозировки ПГ «А» и «Б» приводит к сокращению времени подъема теста, а внесение 4 и 5% дозировок приводит к увеличению времени подъема по сравнению с контролем.

Таким образом, результаты исследований показали, что добавление 5% и более дозировки порошка из древесных грибов «А» и «Б» нецелесообразно вследствие отрицательного влияния на хлебопекарные свойства пшеничной муки.

Полученные в результате проведенного исследования данные позволили сделать вывод о возможности применения в хлебопечении древесных грибов, произрастающих в Алтайском крае. Выявлено, что добавка порошка древесных грибов в количестве 3% улучшает хлебопекарные свойства пшеничной муки и структурно-механические свойства теста. Исходя из этого была разработана рецептура теста для производства хлебобулочных изделий с древесными грибами для производства продуктов повышенной пищевой и биологической ценности, высокого качества, улучшенных органолептических показателей, с функциональными и лечебно-профилактическими свой-

ствами и сохраняющих неизменными названные свойства в процессе хранения.

Библиографический список

- Власова М.В. Формирование потребительских свойств и повышение сохраняемости хлеба из пшеничной муки, обогащенного грибными порошками : дис. ... канд. техн. наук. М., 2011. 143 с.
- ГОСТ 27669-88. Мука пшеничная хлебопекарная. Метод пробной лабораторной выпечки хлеба. М., 2007. 10 с.
- ГОСТ 27839-2013. Мука пшеничная. Методы определения количества и качества клейковины. М., 2014. 20 с.
- Еремина И.А., Кригер О.В. Лабораторный практикум по микробиологии : учебное пособие / Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. Кемерово, 2005. 112 с.
- Жамукова Ж.М. Разработка хлебобулочных изделий функционального назначения с использованием биофлавоноидов зеленого чая : дис. ... канд. техн. наук. М., 2006. 179 с.
- Каяцкая А.С., Бердина А.Н. Обогащение зерненного творага амарантовой мукой // Пищевые инновации и биотехнологии : материалы Междунар. науч.-практ. конф. Кемерово, 2014. Т. 2. С. 63–65.
- Косован А.П., Поландова Р.П. Комплексные технологии пшеничного хлеба для решения проблем качества // Хранение и переработка сельхозсырья. 2005. №2. С. 7–9.
- Могильный М.П. Роль функциональных свойств белков в специальных видах питания // Известия вузов. Пищевая технология. 2009. №1. С. 51–54.
- Филлипова Е.В., Красина И.Б., Хашпакянц Б.О. Инновационные ингредиенты для производства кондитерских изделий // Современные проблемы качества и безопасности продуктов питания в свете требований технического регламента Таможенного союза. Краснодар, 2014. С. 61–62.
- Функциональные пищевые продукты. Введение в технологии. М., 2009. 288с.

УДК 664.681.1(045)

М.В. Обрезкова¹, Е.П. Каменская²

¹Бийский технологический институт (филиал)
Алтайского государственного технического университета
им. И.И. Ползунова (Бийск, Россия)

²Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова (Барнаул, Россия)

Получение мучного кондитерского изделия с использованием комбинированного экстракта из растительного сырья

В настоящее время в соответствии с концепцией здорового питания наблюдается увеличение выпуска и потребления мучных кондитерских изделий с использованием растительного сырья с целью формирования новых качественных характеристик продукта и расширения его ассортимента. Для достижения этих целей в изделия вводят сиропы, настои или экстракты различных видов растений, овощные, плодово-ягодные добавки и продукты их переработки. Особая роль в создании качественно новых пищевых продуктов отводится лекарственным растениям, поскольку благодаря содержанию биологически активных веществ они обладают высокой пищевой ценностью и целебными свойствами. Данная статья посвящена разработке мучных кондитерских изделий, обладающих новыми качественными свойствами, с использованием сывoroточного комбинированного экстракта из сбора лекарственного растительного сырья, состоящего из плодов шиповника майского (*Rosa majalis*) и травы эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*). Изучены основные параметры экстракции биологически активных веществ из растительного сырья: температура, продолжительность процесса экстракции, соотношение сырья и растворителя, в качестве которого использовалась молочная творожная сывoroтка. Экспериментально определены оптимальные условия сывoroточной экстракции растительного сырья: температура 90 °С, модуль 1:10, продолжительность 90 мин, при которых содержание экстрактивных веществ составляет $62,31 \pm 0,92$ %. Сывoro-

точный комбинированный экстракт отличается приятным, мягким и сладким запахом благодаря шиповнику, а эхинацея придает экстракту травянистый аромат и в сочетании с шиповником обеспечивает ему полноту вкуса. Предложено использовать полученный сывороточный экстракт из плодов шиповника майского и травы эхинацеи пурпурной в технологии получения мучных кондитерских изделий в составе кондитерской глазури для покрытия поверхности сдобного печенья, обогащенного дополнительными источниками пищевых волокон и биологически активных веществ – пивной дробинкой (20 % от массы муки) и молочной творожной сывороткой (4 %). Проведены органолептические исследования и дегустационные оценки готовых мучных кондитерских изделий по различным показателям. Сделано заключение о соответствии характеристик сдобного печенья требованиям нормативных документов.

Ключевые слова: мучные кондитерские изделия, растительное сырье, экстракция, пивная дробина, молочная сыворотка.

Приоритетным направлением государственной политики России является формирование системы здорового питания населения, одна из задач которой направлена на разработку и внедрение технологий обогащенных и функциональных продуктов массового потребления (Стратегия развития..., 2012), традиционно пользующихся постоянным и устойчивым спросом у населения. К таким продуктам относятся и мучные кондитерские изделия. Для повышения пищевой ценности и функциональности, а также формирования ассортимента пищевых продуктов с заданными свойствами в них вводят сиропы, настои, экстракты растений, овощные, плодово-ягодные добавки и продукты их переработки (Толстомятова и др., 2014; Струпан и др., 2015; Ларионова и др., 2017).

Особая роль в создании качественно новых пищевых продуктов отводится лекарственным растениям, которые являются источниками биологически активных веществ (БАВ), способных корректировать процессы метаболизма в организме человека. К перспективному сырью относятся плоды шиповника майского (*Rosa majalis*) и трава эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*). Известно, что ценность

плодов шиповника майского как диетического и лекарственного сырья определяется количеством аскорбиновой кислоты, Р-активных полифенолов, каротиноидов и других витаминов (Меняйло и др., 2015). Плоды шиповника служат источником разнообразных углеводов (глюкоза, фруктоза, пектиновые вещества, клетчатка), а также отличаются высоким содержанием органических кислот и золы, богатой калием, кальцием, магнием, фосфором, железом и марганцем (Школьников, Егорова, 2009; Меняйло и др., 2015; Баймуродов и др., 2017).

Одним из лекарственных растений, сочетающих в себе иммуномодулирующие, противовоспалительные, противовирусные и тонизирующие свойства, является эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* L.). Иммуностимулирующее и антимикробное действие этого растения обусловлено присутствием полисахаридов, фенольных соединений и оксикоричных кислот, макро- и микроэлементов, их корреляции с другими веществами. Вируснейтрализующая, а также иммуностимулирующая активность эхинацеи обусловлены наличием в ней сапонинов. Следует отметить, что целебные свойства суммарных препаратов эхинацеи (настоек, экстрактов, соков) намного выше, несмотря на значительную фармакологическую активность отдельных химических составляющих (Бизунок, 2008; Меняйло и др., 2015).

Известно, что компоненты, входящие в состав различных растительных композиций и готовой продукции, могут взаимно усиливать действие друг друга, например, аскорбиновая кислота и флавоноиды, аскорбиновая кислота и дубильные вещества. Поэтому совместное использование плодов шиповника и травы эхинацеи пурпурной может обеспечить синергетический эффект и таким образом способствовать усилению физиологической активности их компонентов, формированию качественно новых функциональных свойств экстрактов.

Ценными источниками БАВ также являются вторичные продукты переработки растительного и животного происхождения, такие как пивная дробина и молочная сыворотка (Волотка и др., 2013; Щетинин, Дорохова, 2013). В настоящее время их вводят в мясные и молочные системы, диетические продукты питания, хлебобулоч-

ные, макаронные и кондитерские изделия в качестве многофункциональной добавки, а также с целью снижения себестоимости готовой продукции (Пономарев и др., 2011; Волотка и др., 2013; Щетинин, Дорохова, 2013; Лесникова и др., 2015). Этому способствует полноценность аминокислотного состава пивной дробины, значительное содержание клетчатки, богатый минеральный и витаминный состав, высокая биологическая эффективность липидной составляющей. Достоинством молочной сыворотки является высокая пищевая и биологическая ценность благодаря содержанию в ней лактозы, оптимально сбалансированных по аминокислотному составу белков, а также жизненно важных минеральных соединений.

Поэтому на основании вышесказанного целью данной работы являлось получение сдобного печенья функционального назначения с использованием комплексного сывороточного экстракта из растительного сырья.

Для исследований были выбраны следующие виды лекарственного растительного сырья: плоды шиповника майского (*Rosa majalis*) и трава эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea*).

В ходе работы физико-химические и органолептические показатели контролировали по стандартным методикам, регламентированным соответствующей нормативной документацией на сырье и готовые продукты. Для проведения микробиологического контроля качества готовых мучных изделий в соответствии с требованиями ТР ТС 021/2011 применяли методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (по ГОСТ 10444.15-94), дрожжей и плесневых грибов (по ГОСТ 10444.12-2013), наличие бактерий группы кишечных палочек (колиформных бактерий) – по ГОСТ 31747-2012).

Известно, что эффективность экстракции БАВ зависит от таких параметров, как температура, продолжительность экстракции, соотношения сырья и растворителя. Поэтому в данной работе проводили уточнение этих параметров для выбранного сырья. Для экстракции растительное сырье было взято в равных соотношениях, которое для увеличения поверхности контакта фаз и облегчения процесса экстракции предварительно измельчали до размера частиц 1 мм. Массовая доля экстрактивных веществ в плодах шиповника майского

и траве эхинацеи пурпурной составляла $32,3 \pm 0,7$ и $24,2 \pm 0,4$ % соответственно.

В качестве экстрагента использовали молочную творожную сыворотку с кислотностью 64 °Т и массовой долей сухих веществ $6,30 \pm 0,45$ %.

В современной практике экстракцию лекарственных или биологически активных веществ из растительного сырья проводят как при умеренных (20 ± 5 °С), так и при повышенных (40–100 °С) температурах. В настоящей работе экстракцию осуществляли при различных температурных режимах в диапазоне от 30 до 120 °С в течение двух часов с периодическим перемешиванием (модуль 1:10 и 1:20). По истечении обозначенного времени постепенно охлаждали сосуд с растительным сырьем до температуры 20 °С. При каждом температурном режиме с периодичностью 30 мин в экстрактах осуществляли контроль массовой доли экстрактивных веществ.

В ходе исследований наблюдали, что при модуле 1:20 выход экстрактивных веществ в среднем в 1,5 раза меньше, чем при модуле 1:10. Было установлено, что оптимальная продолжительность экстракции составила 90 мин при температуре 90 °С и модуле 1:10, при этом содержание экстрактивных веществ достигало $62,31 \pm 0,92$ %, аскорбиновой кислоты – $3,2 \pm 0,4$ мг%. Дальнейшее повышение температуры до 120 ° и увеличение продолжительности процесса до 120 мин приводило к незначительному приросту экстрактивных веществ (всего на 2 %), поэтому использование этих режимов при экстракции нецелесообразно.

Полученный сывороточный комбинированный экстракт из плодов шиповника майского и травы эхинацеи пурпурной по внешнему виду представляет собой однородную непрозрачную жидкость оранжево-коричневого цвета с приятным, мягким и сладким запахом благодаря шиповнику; а эхинацея придает экстракту травянистый аромат и в сочетании с шиповником обеспечивает ему полноту вкуса.

В дальнейшем комбинированный экстракт из плодов шиповника майского и травы эхинацеи пурпурной вводили в состав глазури для покрытия мучных кондитерских изделий, которые изготавливали по рецептуре сдобного печенья (см. табл. 1) при температуре среды пекарной камеры 200–220 °С в течение 15 мин. С целью обо-

гащения сдобного печенья дополнительными источниками пищевых волокон и БАВ в рецептуру первого образца вводили муку из пивной дробины со степенью дисперсности 60 мкм, частично (20 % от массы муки) заменив ею пшеничную, а во второй образец – молочную творожную сыворотку (4 %). Контролем служил образец без внесения дополнительных компонентов.

Таблица 1

Рецептура сдобного печенья

Сырье	Расход сырья сдобного печенья, %		
	без добавок (контроль*)	с пивной дробиной	с молочной сывороткой
Яйцо куриное	9,73	10,03	8,87
Мука пшеничная 1-го сорта	48,60	39,0	49,26
Сахар	21,60	22,33	19,70
Разрыхлитель теста	0,54	0,57	0,50
Сливочное масло	19,45	20,17	17,73
Дробина пивная	–	7,81	–
Молочная сыворотка	–	–	3,94
Итого	100	100	100

* (Бутейкис, 2014).

На рисунке 1 представлен внешний вид образцов сдобного печенья.



Рис. 1. Внешний вид сдобного печенья: а) без добавок; б) с добавлением муки из пивной дробины (20 %); в) с добавлением молочной сыворотки (4 %)

Дегустационную оценку показателей сдобного печенья, таких как внешний вид, цвет, аромат, чистота и гармоничность вкуса и другие, осуществляли по 25-балльной системе (рис. 2). Результаты свидетельствуют, что все образцы печенья имели пористую структуру, без пустот и следов непромеса, выраженные вкус и запах, свойственные входящим в рецептуру компонентам. Так, сыровотка придала изделию светло-коричневый цвет с молочным оттенком и приятный молочный вкус и аромат, что позволило набрать образцу 23 балла. Присутствие в молочной сыворотке жизненно важных соединений: лактозы, молочного жира, белковых веществ и другого – способствует повышению пищевой ценности печенья. В изделии с пивной дробинкой в изломе видны вкрапления частиц темного цвета, поверхность образцов сдобного печенья шероховатая, что не противоречит требованиям ГОСТ 24901-2014. Однако по внешнему виду образец с пивной дробинкой несколько уступил контрольному (24 и 25 баллов соответственно). Массовая доля влаги каждого образца не превышала 16 %.

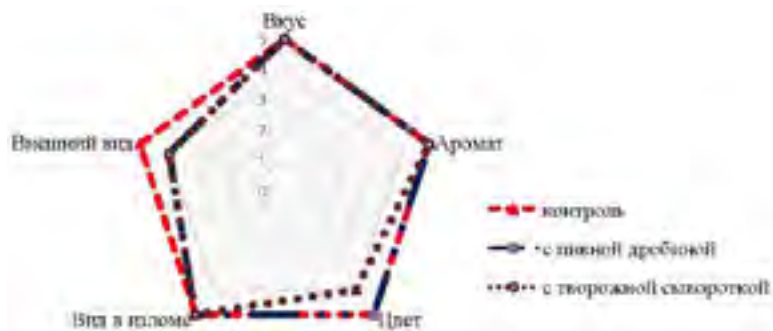


Рис. 2. Профилограмма органолептических показателей сдобного печенья

Для улучшения пищевых и вкусовых качеств печенья, а также придания им блеска и гладкости изделия сверху покрывали какаоcодержащей кондитерской глазурью на сахаре, в которую вводили сывороточный комбинированный фитоэкстракт в количестве 45%. Глазурь темно-коричневого цвета имела сладкий, приятный вкус и послевкусие шиповника; консистенция однородная,

без ощутимых частиц сахара, какао-продуктов, однако несколько липкая, что, вероятно, объясняется высоким содержанием экстракта. Тем не менее к ее преимуществам можно отнести сохранение экстрактивных и сухих веществ сывороточного экстракта, что способствует формированию новых качественных характеристик сдобного печенья и расширению ассортимента мучных кондитерских изделий.

Для микробиологического контроля проводили отбор проб свежеизготовленного сдобного печенья. Результаты исследования микробиологической чистоты изделий, приведенные в таблице 2, свидетельствуют о микробиологической безопасности мучных кондитерских изделий с добавлением пивной дробины и молочной сыворотки, поскольку все образцы соответствуют требованиям действующей нормативной документации.

Таблица 2

Микробиологические показатели качества свежеизготовленного сдобного печенья

Показатель	Допустимые уровни по ТР ТС 021/2011	Печенье		
		без добавок (контроль)	с пивной дробинкой	с молочной сывороткой
Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), КОЕ/г	Не более $1,0 \times 10^4$	10	50	20
Бактерии группы кишечной палочки (колиформы), г	Не допускаются в массе продукта 0,1	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
Дрожжи, КОЕ/г	Не более 50	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
Плесени, КОЕ/г	Не более 100	не обнаружено	не обнаружено	не обнаружено

Таким образом, на основании результатов исследований можно сделать вывод, что для получения сдобного печенья с новыми качественными характеристиками, повышения их пищевой ценности и придания им профилактических свойств можно рекомендовать использовать сывороточный экстракт из плодов шиповника и травы эхинацеи пурпурной с одновременным моделированием рецептурного состава за счет введения пивной дробины или молочной сыворотки.

Библиографический список

Баймуродов Р.С., Кароматов Дж., Нурбобоев А.У. Шиповник – профилактическое и лечебное средство // Биология и интегративная медицина: электронный научный журнал. 2017. № 10 [Электронный ресурс]. URL: <http://integmed.uz/16/16num.pdf>.

Бизунок Н.А. Фармакологические свойства эхинацеи // Рецепт. 2008. № 5(61). С. 42–49.

Бутейкис Н.Г., Жукова А.А. Технология приготовления мучных кондитерских изделий. М., 2014. 336 с.

Волотка Ф.Б., Богданов В.Д. Технологическая и химическая характеристика пивной дробины // Вестник ТГЭУ. 2013. № 1(65). С. 114–124.

Ларионова Е.И., Козубаева Л.А., Ларионова И.А. Оптимизация рецептуры сахарного печенья с красной и черноплодной рябиной // Ползуновский вестник. 2017. № 2. С. 37–40.

Лесникова Н.А., Лаврова Л.Ю., Борцова Е.Л. Использование пивной дробины в производстве пряничных изделий // Хлебопродукты. 2015. №7. С. 44–46.

Научные основы формирования ассортимента пищевых продуктов с заданными свойствами. Технологии получения и переработки растительного сырья: коллективная монография / Л.Н. Меняйло, И.А. Батурина, О.Ю. Веретнова [и др.] ; под науч. ред. Л.Н. Меняйло. Красноярск, 2015. 212 с. [Электронный ресурс]. URL: <http://biblioclub.ru/index.php?page=book&id=435701>.

Пономарев В.Я., Юнусов Э.Ш., Ежкова Г.О. Использование вторичного растительного сырья в технологии мясных продуктов // Вестник КТУ. 2011. № 18. С. 156–158.

Стратегия развития пищевой и перерабатывающей промышленности Российской Федерации до 2020 года: Распоряжение Правительства Российской Федерации от 17.04.2012 № 559-р [Электронный ресурс]. URL: <http://docs.cntd.ru/document/902343994>.

Струпан Е.А., Полонский В.И., Демиденко Г.А. Технология получения экстрактов из дикорастущего растительного сырья, применяемого в пищевой промышленности и фитотерапии // Вестник КрасГАУ. 2015. № 11(110). С. 154–163.

ТР ТС 021/2011 Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции».

Толстопятова В.А., Переварихани А.А. Использование нетрадиционного растительного сырья в производстве хлебобулочных и мучных кондитерских изделий // Научные записки ОрелГИЭТ. 2014. № 2(10). С. 380–387.

Школьников М.Н., Егорова Е.Ю. Товароведно-технологическая характеристика растительного сырья, используемого в производстве бальзамов и БАД. Бийск, 2009. 160 с.

Щетинин М.П., Дорохова А.С. Производство и переработка молочной сыворотки в России и Алтайском крае // Ползуновский вестник. 2013. № 4-4. С. 80–84.

УДК 637.1

Т.Н. Орлова, Е.Ф. Отт, Р.В. Дорофеев

*Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий
(Барнаул, Россия)*

Селекция лактобактерий для производства ферментируемых молочных продуктов

Представлена информация об актуальности проведения работы по селекции молочнокислых бактерий, перспективных для включения в состав бактериальных заквасок. Рассматриваются проблемы,

связанные с необходимостью производства отечественных бактериальных заквасок и препаратов для молочной промышленности. Приведены результаты по выделению и изучению штаммов мезофильных лактококков на базе лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдела Сибирского НИИ сыроделия ФГБНУ ФАН-ЦА. За период исследования были изучены морфолого-культуральные, физиолого-биохимические и технологически-ценные свойства 32 штаммов выделенных мезофильных лактококков. По результатам тестирования выделенные лактококки были отнесены к *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. diacetylactis*, *L. lactis ssp. cremoris*. Для включения в состав бактериальных заквасок выделенные штаммы были проверены их технологически ценные свойства: кислотообразующая активность, терморезистентность, солеустойчивость, антибиотикоустойчивость и фагоустойчивость. По результатам проведённых исследований на выделенные штаммы мезофильных лактококков были оформлены паспорта.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, лактобактерии, лактококки, селекция лактобактерий, выделение чистых культур, технологически ценные свойства лактобактерий, бактериальные закваски, бактериальные препараты.

Введение. При производстве ферментированных молочных продуктов используются разные штаммы и виды молочнокислых бактерий, от которых зависит качество и безопасность продукта. Молочнокислая микрофлора осуществляет преобразование основных компонентов молока (лактоза, белки, жиры) во вкусовые, ароматические, биологически активные вещества, а также подавляет рост технически вредных микроорганизмов (Банникова, 1987).

На российском рынке сегодня доминируют импортные бактериальные закваски и препараты (Chr. hansen, DSM, Danisco и др.), в меньшей степени – отечественные (на их долю приходится не более 10% от общего объема рынка). При этом отечественные закваски считаются достаточно конкурентоспособными, на том основании, что микроорганизмы, входящие в их состав, выделены из местных природных источников. По словам самих производителей, импорт-

ные закваски не всегда эффективно работают на местном сырье. Известны случаи, когда импортные культуры не подходили для выпуска продукции из отечественного молока-сырья, которое в силу климатических и географических причин отличается от импортного. Кроме того, стоимость российских бактериальных препаратов в среднем на 30–40% ниже, чем импортных, что немаловажно для молокоперерабатывающих предприятий с экономической точки зрения.

Выделение чистых культур молочнокислых бактерий является основой по созданию любой отраслевой коллекции микроорганизмов. Несмотря на имеющийся фонд коллекционных штаммов молочнокислых бактерий, активно используемых в промышленных целях, работа по выделению новых штаммов и изучению их технологически ценных свойств не утрачивает своей актуальности.

Большая часть молочнокислых бактерий, выделяемых из различных природных источников, не удовлетворяет требованиям, предъявляемым к заквасочным штаммам в молочной промышленности. А те немногочисленные штаммы, которые при выделении обладали производственно ценными свойствами, после определенного срока эксплуатации ослабевают, поэтому требуется их замена другими штаммами (Орлова, 2015; Цугкиев, 2015).

Современные биотехнологические методы (индуцированный мутагенез, генная инженерия и пр.) позволяют быстро получать штаммы с заданными свойствами. Но к продукции, полученной с применением таких методов, у потребителей складывается неоднозначное отношение. Более того, в настоящее время как в России, так и в мире отмечается тренд на потребление исключительно натуральных продуктов. В связи с этим проводятся работы по поиску отечественных конкурентоспособных стартовых культур, полученных естественным путём. Поэтому традиционная селекция молочнокислых бактерий с технологически ценными свойствами имеет большое значение (Смирнов, 2008; Соловьёва, 2010).

Сотрудники лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдела Сибирского НИИ сыроделия (СибНИИС) ФГБНУ ФАНЦА на протяжении многих лет занимаются выделением и изучением свойств пропионовокислых и молочнокислых бактерий

(Сибирская коллекция микроорганизмов – СКМ). Коллекция лаборатории насчитывает несколько сотен штаммов, принадлежащих главным образом к тем видам, которые представляют интерес с точки зрения их практического использования в молочной промышленности и сельском хозяйстве.

Объекты и методы исследования. Объектами исследований служили культуры мезофильных молочнокислых бактерий, выделенные из природных источников (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *diacetilactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris*). Для работы с микроорганизмами использовали стандартные питательные среды и методы микробиологического анализа согласно МР 2.3.2.2327-08 от 07.01.2008, а также ГОСТ 33951-2016. Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов от 23.12.2016.

Результаты и их обсуждение. Исследования по изучению вновь выделенных штаммов мезофильных лактококков как наиболее представительной части заквасочной микрофлоры ферментированных молочных продуктов и сыров проводили в течение 2016–2017 гг. в лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдела СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА.

Для выделения молочнокислых бактерий использовали сырое коровье и козье молоко.

Выделение чистых культур лактококков проводили многократным пассажем в стерильное обезжиренное молоко с последующим культивированием при оптимальной для мезофильных лактококков температуре 30 °С. Выделение и селекция молочнокислых бактерий выполнялась по следующей схеме:

- 1) выбор источников выделения и отбор образцов;
- 2) обогащение (накопительная культура);
- 3) выделение и очистка культур;
- 4) идентификация выделенных культур;
- 5) тестирование штаммов на наличие производственно-ценных свойств;
- 6) паспортизация штаммов.

Из 150 штаммов, выделенных за время исследования, для дальнейшей работы были отобраны 80 штаммов лактококков. Критериями первоначального отбора являлись следующие показатели:

- 1) способность выделенных штаммов образовывать плотный, ровный сгусток на стерильном обезжиренном молоке в течение 18–24 часов при температуре 30 °С на протяжении 3–4-х пассажей;
- 2) типичность и однородность колоний при повторном рассеве выделенных штаммов;
- 3) типичность и однородность клеток по микроскопическому препарату.

Чистые культуры мезофильных лактобактерий, используемые для приготовления кисломолочных продуктов и сыров, должны образовывать плотный, ровный сгусток на молоке при дозе инокулюма 5% при 30 °С в течение 6–8 часов, чистый кисломолочный вкус и аромат. Каждый из 80 отобранных штаммов был продегустирован. По результатам дегустации для дальнейших исследований были отобраны 32 штамма лактококков, которые удовлетворяли требованиям по органолептическим показателям.

По предварительным результатам идентификации из 32 отобранных штаммов 22 штамма были отнесены к *L. lactis ssp. lactis*, шесть штаммов – к *L. lactis ssp. diacetylactis*, четыре штамма – к *L. lactis ssp. cremoris*. Идентификацию микроорганизмов по морфолого-культуральным и физиолого-биохимическим свойствам проводили согласно прописи «Определителя Берджи» (Bergey, 2009). Данные по идентификации представлены в таблице 1.

Таблица 1

Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства выделенных штаммов мезофильных лактококков

№	Вид	Способность образовывать ННЗ из аргинина	Цвет колоний на среде для <i>L. cremoris</i>	Зоны лизиса на среде с цитратом Ca ²⁺
1	<i>L. lactis</i>	+	белый	-
2	<i>L. diacetylactis</i>	+/-	белый	+
3	<i>L. cremoris</i>	-	жёлтый	-

При производстве бактериальных препаратов для кисломолочных продуктов и сыров очень важно, чтобы штаммы, входящие в их состав, обладали определёнными технологически ценными свой-

ствами. С этой целью исследуемые штаммы мезофильных лактококков были тестированы на следующие показатели:

- 1) кислотообразующая активность;
- 2) устойчивость к NaCl;
- 3) терморезистентность;
- 4) антибиотикоустойчивость;
- 5) фагоустойчивость.

В производстве различных видов сыров и кисломолочных продуктов одним из основных свойств, определяющих технологический процесс и качество готовых продуктов, является кислотообразующая активность молочнокислой микрофлоры. Именно этот показатель на примере производства сыра влияет на продолжительность свертывания молока, реологические и синергетические свойства получаемого сгустка, его способность к дальнейшей обработке.

При определении кислотообразующей активности у выделенных штаммов мезофильных лактококков определяли не только титруемую кислотность сгустка через 18 часов (при дозе инокулюма 1%), но и титруемую кислотность сквашенного молока через четыре часа (при дозе инокулюма 5%), так как в зависимости от технологического процесса, используемого при производстве того или иного кисломолочного продукта, мы должны учитывать скорость нарастания кислотности. Данные по определению кислотообразующей активности представлены в таблице 2.

Таблица 2

Титруемая кислотность выделенных штаммов мезофильных лактококков

Титруемая кислотность через 4 ч., (доза инокулюма 5%)			Титруемая кислотность через 18 ч., (доза инокулюма 1%)		
Группа кислотообра- зователей	Титру- емая кислот- ность, Т	% от обще- го кол-ва штаммов	Группа кислото- образова- телей	Титруе- мая кис- лотность, оТ	% от общего кол-ва штаммов
Сильные	≥44	71,86	Сильные	≥80	96,88
Средние	40-43	12,50	Средние	70-79	3,13
Слабые	<40	15,63	Слабые	<70	-

Более 71% выделенных штаммов через четыре часа имели титруемую кислотность ≥ 44 оТ. Титруемую кислотность более 80 оТ через 18 часов культивирования имел 31 штамм из 32 (96,88%).

Одним из основных технологически ценных свойств при селекции молочнокислых бактерий является устойчивость к NaCl. Соль регулирует микробиологические, биохимические и физико-химические процессы во время выработки и созревания сыра, тем самым оказывает косвенное влияние на показатели качества продукта. Результаты исследования выделенных штаммов на солеустойчивость представлены на рисунке 1. Все исследуемые штаммы дали рост при концентрации 2% NaCl в питательной среде. При повышении концентрации NaCl (4% в питательной среде) один штамм не показал роста. Повышение концентрации NaCl в питательной среде (6,5%) оказало ингибирующее влияние на ростовые факторы большинства тестируемых штаммов.

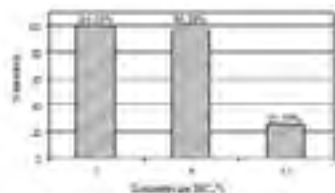


Рис. 1. Устойчивость выделенных штаммов мезофильных лактококков к NaCl

Терморезистентность выделенных лактококков проверяли при температуре 65 °С с выдержкой 30, 60 и 90 минут. Исследования показали, что 71,88% штаммов выдерживают нагревание в течение 30 и 60 минут, 37,50% штаммов – 90 минут. Результаты представлены на рисунке 2.

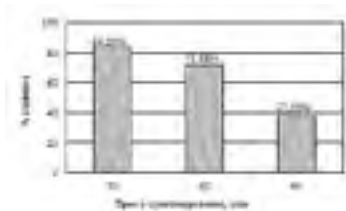


Рис. 2. Терморезистентность выделенных штаммов мезофильных лактококков

Техническим регламентом Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013) установлены допустимые уровни содержания антибиотиков в молоке и молочных продуктах. Большинство антибиотиков (амикацин, ампициллин, левомицетин, пенициллин, тетрациклин, гентамицин и т.д.) ингибируют рост молочнокислой заквасочной микрофлоры, по отношению к некоторым антибиотикам чувствительность молочнокислых бактерий может варьировать, поэтому необходима проверка лактококков на антибиотикоустойчивость. При исследовании использовали препараты антибиотиков: пенициллин и тетрациклин. По результатам исследований установлено, что к пенициллину в концентрации 0,004 мг/л устойчивы 71,88% исследуемых штаммов, частично устойчивы – 28,12%. По отношению к тетрациклину в концентрации 0,01 мг/л устойчивыми оказались 31,25% штаммов, 1 штамм (3,12%) был чувствителен, большая часть штаммов (65,63%) проявили частичную устойчивость к антибиотику. Результаты по антибиотикоустойчивости штаммов мезофильных лактококков представлены на рисунке 3.

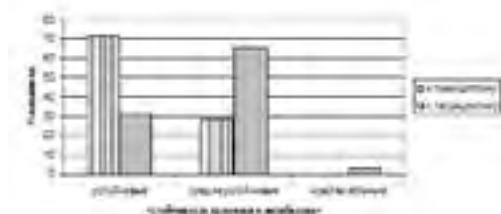


Рис. 3. Антибиотикоустойчивость выделенных штаммов мезофильных лактококков

Активность молочнокислой микрофлоры является одним из главных условий получения ферментируемой молочной продукции высокого качества, как по органолептическим показателям, так и по показателям безопасности. В 80–90% случаях причиной снижения активности молочнокислой микрофлоры является действие бактериофага. Установлено, что причиной большинства неудачных выработок кисломолочных продуктов являются лактофаги. Поэтому при выработке молочных продуктов для снижения вероятности

инактивации молочнокислой микрофлоры под действием бактериофагов в ее состав вводят по несколько штаммов молочнокислых бактерий одного и того же вида, кроме того, постоянно проводят ротацию бактериальных заквасок.

В схему селекции ввели тест на проверку выделенных лактококков по отношению к бактериофагам из коллекции лаборатории микробиологии молока и молочных продуктов отдела СибНИИС ФГБНУ ФАНЦА. Для оценки степени фагоустойчивости штамма использовали индекс фагочувствительности (ИФ), т.е. отношение количества фагов, лизирующих штамм, к общему количеству использованных фагов.

Степень фагочувствительности штаммов:

- 1) слабочувствительные – ИФ менее 0,3;
- 2) среднечувствительные – 0,31–0,7;
- 3) высокочувствительные – 0,71–1.

Из тестируемых лактококков к малочувствительным были отнесены 59,38% штаммов, к среднечувствительным – 37,5% и один штамм проявил высокую чувствительность к коллекционным бактериофагам (ИФ 0,75). Результаты представлены на рисунке 4.

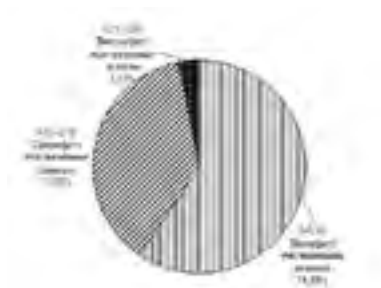


Рис. 4. Фагоустойчивость выделенных штаммов мезофильных лактококков

В результате проведенных исследований на вновь выделенные штаммы лактококков были оформлены паспорта. По результатам тестирования штаммов можно отметить, что достаточно сложно проводить идентификацию бактерий рода *Lactococcus* на видовом и внутривидовом уровнях с помощью классических фенотипических

методов. Поэтому в соответствии с современными научными представлениями дальнейшее изучение выделенных лактобактерий планируется проводить на генетическом уровне. Работа по выделению и селекции перспективных штаммов лактобактерий будет продолжена.

Выводы. За время исследований по результатам идентификации было выделено 22 штамма *L. lactis ssp. lactis*, 6 штаммов – к *L. lactis ssp. diacetylactis*, 4 штамма – к *L. lactis ssp. cremoris*, перспективных для вхождения в состав бактериальных заквасок и бактериальных препаратов для производства ферментируемых молочных продуктов.

Выделенные штаммы мезофильных лактококков были изучены по технологически ценным свойствам: кислотообразующая активность, терморезистентность, солеустойчивость, антибиотикоустойчивость и фагоустойчивость. По результатам проведённых анализов на вновь выделенные штаммы оформлены паспорта.

Библиографический список

- Банникова Л.А., Королёва Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. М., 1987. 400 с.
- Орлова Т.Н., Иркитова А.Н. Выделение молочнокислых бактерий из объектов природного происхождения и отбор среди них штаммов, наиболее перспективных для создания бактериальных заквасок и концентратов // Биотехнология и общество в XXI веке. Барнаул, 2015. С. 232–235.
- Смирнов Е.А., Сорокина Н.Л. Бактериальные закваски и концентраты в биотехнологии сыроделия // Сыроделие и маслоделие. 2008. № 6. С. 17.
- Соловьёва И.В., Точилина А.Г., Новикова Н.А. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus*. Общая биология // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2010. № 2 (2). С. 462–468.
- Цугкиев Б.Г. и др. Характеристика выделенных в РСО-Алания молочнокислых бактерий и их использование // Биотехнология и общество в XXI веке : материалы Международного биотехнологического симпозиума «BioAsia Altai 2015». Барнаул, 2015. С. 282–288.
- Bergey's manual of systematic bacteriology second edition volume three

the Firmicutes – Springer Science+Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 2009. 1422 p.

УДК 661.728.7:66.083.4

И.Н. Павлов

*Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского
отделения Российской академии наук (Бийск, Россия)*

Оценка автогидролитической предварительной обработки мискантуса с помощью горячей воды в жидком состоянии

В настоящей работе проведена оценка предварительной обработки мискантуса методом автогидролиза в жидкой горячей воде с целью получения в дальнейшем биоэтанола. Предварительную обработку проводили в реакционной камере универсальной термобарической установки с рабочим объемом 2,3 литра в условиях изменения температур 160, 180, 200 и 220 °С, при времени выдержки 60 мин, соответствующих факторам тяжести от 3,58 до 5,77. Модуль обработки 1:10. В ходе обработки производили маятниковое качание реакционной камеры для перемешивания реакционной массы. Твердые фракции, полученные в выбранных условиях автогидролиза, подвергали ферментативному гидролизу с использованием ферментного комплекса, состоящего из препаратов «Целлолюкс-А» и «Брюзайм BGX». Жидкую фракцию анализировали для определения концентрации глюкозы и ксилозы. Результаты, полученные в процессе предварительной обработки, показали снижение концентрации гемицеллюлоз до минимального значения 0,2 %, присутствующее в твердой фракции при значении фактора тяжести 5,37 при обработке при 220 °С. Снижение уровня гемицеллюлоз в твердых фракциях привело к заметному улучшению ферментативной усвояемости с накоплением редуцирующих веществ до 42,5 % с максимальным выходом

дом при R 4,77. На результат ферментативного гидролиза оказывает присутствие лигнина в обработанных твердых фракциях. Повышение уровня тяжести обработки приводит к повторной полимеризации лигнина и повышению его содержания до 35,8 % при уровне тяжести 4,77 (при 200 °C) и до 44,0 % при увеличении температуры обработки до 220 °C при факторе тяжести 5,37. Этот факт ограничивает действие ферментов и приводит к снижению выхода редуцирующих веществ при гидролизе твердых фракций, обработанных при температурах 200 и 220 °C. Полученные результаты свидетельствуют о потенциале использования автогидролитической обработки для мискантуса в жидкой горячей воде и необходимости поиска оптимальных условий обработки для повышения ферментативной усвояемости твердых фракций.

Ключевые слова: лигноцеллюлозная биомасса, мискантус, предварительная обработка, жидкая горячая вода, ферментативный гидролиз, биоэтанол.

Введение. Чтобы избежать проблем с продовольственной безопасностью, лигноцеллюлозные материалы (ЛЦМ) являются более подходящим исходным сырьем в производстве биоэтанола, чем крахмалистые материалы или сахароза, которые могут использоваться в качестве пищи или корма. Основным элементом ЛЦМ, используемым в технологии получения биоэтанола, является целлюлоза, после гидролиза которой получают глюкозу, которую в дальнейшем преобразуют в этанол (Walsum et al., 2004; Kabel et al., 2007; Skiba et al., 2017). Из-за сложной структуры ЛЦМ, связанной с содержанием лигнина, гемицеллюлоз и недоступностью целлюлозы, растительная биомасса обладает высокой устойчивостью к ферментативной обработке. Для снижения устойчивости и повышения доступности целлюлозы используют различные физические и химические методы предварительной обработки, включая обработку разбавленной кислотой (Harun et al., 2011), щелочную обработку (Wan et al., 2011), обработки органическими растворителями (Mesa et al., 2011), паровым взрывом (Ballesteros et al., 2006), сверхкритическим CO₂ (Kim et al., 2001). Широкое применение находят методы автогидролиза, в част-

ности, обработка жидкой горячей водой под повышенным давлением (Rogalinski et al., 2008). По этому методу предварительная обработка ЛЦМ осуществляется в среде без химических веществ и главным образом влияет на удаление гемицеллюлоз, обеспечивая повышение пористости и доступности поверхности целлюлозы для действия ферментов (Mosier et al., 2005). Во многих исследованиях показано, что предварительная обработка с использованием жидкой горячей воды способна существенно снизить неустойчивость клеточной стенки лигноцеллюлозной биомассы вследствие достигаемых эффектов: изменение структуры целлюлозы, солюбилизация гемицеллюлоз, деградация лигнина (Laser et al., 2002; Williams, et al., 2002; Li et al., 2017). Одним из ограничений предварительной обработки путем горячей воды в жидком состоянии является низкая степень делигнификации, вследствие чего оставшийся лигнин может препятствовать ферментативному гидролизу. В ряде исследований при этом выявлено, что делигнификация сыграла менее важную роль, чем удаление гемицеллюлоз в улучшении ферментативного гидролиза (DeMartini et al., 2013; Leopoldo et al., 2017). Кроме этого, деполимеризация фракции гемицеллюлоз приводит к экономически перспективному процессу получения этанола. Это связано с тем, что выделяемые после обработки целлюлоза и гемицеллюлозы могут быть разделены и гидролизированы до сахаров и преобразованы в дальнейшем до этанола.

Целью данной работы являлось проведение предварительной автогидролитической обработки мискантуса в горячей воде, находящейся в жидком состоянии при повышенной температуре. Оценка эффективности обработки определялась по изменению состава твердых фракций биомассы после обработки, в частности, по гидролизу гемицеллюлоз, а также по улучшению усвояемости твердой фракции при ферментативном гидролизе.

Материалы и методы исследований. В экспериментальном исследовании использовался мискантус сорта Сорановский, выращенный на экспериментальной площадке ИПХЭТ СО РАН. Для проведения эксперимента использовалась вся наземная часть растения, представленная стеблем с междоузлиями, листом, имеющая следующий химический состав: целлюлоза – 52,1%; лигнин – 18,6%; гемицеллюлозы – 21,3%; зола – 4,8% от массы абсолютно сухого сырья

(а.с.с.). Перед началом работы всю сухую массу измельчали до размера частиц 10–15 мм.

Предварительная обработка проводилась на универсальной термобарической установке, в состав которой входит реакционная камера с общим объемом 2,3 л, оснащенная внешним нагревательным элементом с регулировкой температуры в камере с помощью ПИД-регулятора. Проведена обработка биомассы мискантуса при различных температурных условиях: 160, 180, 200 и 220 °С при времени выдержки 60 мин, соответствующих факторах тяжести от 3,58 до 5,77. Условия для автогидролиза определяли с использованием фактора тяжести в качестве параметра, который сочетает время и температуру обработки. определен в соответствии с уравнением (Overend et al., 1987):

$$R = \log \left(t \exp \left(\frac{t_H - t_R}{14,75} \right) \right),$$

где t – время обработки в минутах; t_H – температура в °С; t_R – эталонная температура 100 °С. Значение 14,75 является эмпирическим параметром, связанным с энергией активации и температурой.

Обработка мискантуса навеской 100 г проводилась в водной суспензии с гидромодулем 1:10 (масса / объем воды). Суспензию помещали в реакционную камеру, после чего нагревали до рабочей температуры и обрабатывали в течение заданного времени. Рабочую камеру размещали на платформе, где происходило ее маятниковое качание для перемешивания массы. По завершении обработки реакционная камера охлаждалась до температуры 30–35 °С, после чего реакционную массу выгружали из аппарата. Реакционную массу разделяли фильтрованием. Жидкую фракцию анализировали для определения концентрации глюкозы и ксилозы. После отжима твердую фракцию промывали водой (в 30 раз больше объема материала), отжимали и сушили на воздухе до влажности 7–10 % для проведения ферментативных тестов на усвояемость.

Ферментативный гидролиз твердых фракций проведен в ацетатном буфере с использованием ферментного комплекса, состоящего из ферментных препаратов «Целлолюкс-А» и «Брюзайм ВGX» (Makarova et al., 2014, Budaeva et al., 2016).

Работы, выполненные в рамках данного исследования, проводились с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, Бийск).

Результаты и их обсуждение. После предварительной автогидролитической обработки при различных температурах в полученных образцах твердой фракции определено содержание основных компонентов: лигнин, целлюлоза и гемицеллюлозы. Также выявлено изменение суммарного содержания глюкозы и ксилозы в отобранных жидких фракциях. Полученные данные представлены в таблице 1 в зависимости от температуры обработки и фактора тяжести.

Таблица 1

Состав твердых и жидких фракций после автогидролитической обработки

Показатель	Состав			
Температура, °C	160	180	200	220
Фактор тяжести, R	3,58	4,17	4,77	5,37
Выход, %	89,0	61,9	57,0	45,5
Твердая фракция, %				
целлюлоза	58,0	79,7	73,2	62,0
лигнин	22,5	26,5	35,8	44,0
гемицеллюлозы	18,2	5,3	0,8	0,2
Жидкая фракция (глюкоза + ксилоза), г/л	0,0	16,5	10,8	8,0

После предварительной обработки с увеличением фактора тяжести происходит гидролиз гемицеллюлоз. Содержание гемицеллюлоз в твердой фракции при меньшем факторе тяжести 3,58 (при 160 °C) оставляет 18,2 %, значительное снижение концентрации гемицеллюлоз наблюдается при увеличении фактора тяжести до 4,17 (при 180 °C), составляет 5,3 % и совпадает с максимальным накоплением редуцирующих веществ в жидкой фракции 12,5 %. Поскольку низкий уровень тяжести обработки при факторе 4,17 (при температуре 180 °C) не вызывает гидролиза целлюлозы, то можно судить о том, что в жидкой фракции присутствует только

ксилоза. Практически полный гидролиз гемицеллюлоз происходит с увеличением уровня тяжести обработки до 4,77 при 200 °С и снижением до минимального значения 0,2%, присутствующее в твердой фракции при значении фактора тяжести 5,37 и обработке при 220 °С. В качестве другого фактора, который также свидетельствует об изменениях, проходящих при гидротермической обработке, является изменение содержания целлюлозы в твердой фракции. Можно заметить, что увеличение тяжести обработки вызвало увеличение содержания целлюлозы относительно начального в нативной биомассе с 58,0% при тяжести обработки 3,58 до 79,7% при R 4,17. Повышение уровня целлюлозы связано с гидролизом гемицеллюлоз и последующим удалением остатков из твердой фракции при промывке. Максимальное содержание целлюлозы 79,7%, присутствующее в твердой фракции, было достигнуто при 180 °С и уровне тяжести обработки R 4,17. Дальнейшее увеличение тяжести обработки, связанное с повышением температуры процесса, приводит к частичному гидролизу целлюлозы и снижению содержания в твердой фракции до 73,2% при факторе тяжести 4,77 (при температуре 200 °С) и до 62,0 % при R 5,37. Образующаяся в результате гидролиза глюкоза переходит в состав жидкой фракции вместе с ксилозой. Однако с повышением тяжести обработки суммарное содержание глюкозы и ксилозы в жидкой фракции снижается с максимального присутствия 12,5 г/л до 8,0 г/л при факторе тяжести 5,37 (температура 220 °С). Это снижение можно объяснить превращением ксилозы в побочные продукты, такие как фурфурол и муравьиная кислота, которые могут выступать как ингибиторы при последующем ферментативном гидролизе в случае их повышенного накопления во фракции.

Гидротермическая обработка приводит к потере массы, в результате чего происходит снижение выхода твердых веществ с 89,0% при тяжести обработки 3,58 (при 180 °С) до 45,5% при тяжести обработки 5,37 (при 220 °С) (табл. 1). Такое снижение связано, как показано ранее, с гидролизом гемицеллюлоз до их полного отсутствия при тяжести обработки R 5,37, а также с частичным гидролизом целлюлозы при достижении тяжести обработки 4,77 (при 200 °С) и дальнейшем увеличении до 5,37 (при 220 °С).

Для оценки эффективности проведенной гидротермической обработки выполнили ферментативный гидролиз необработанной биомассы мискантуса и предварительно обработанной твердой фракции. В результате гидролиза получены данные по изменению накопления редуцирующих веществ (РВ) (табл. 2). Ферментативный гидролиз субстратов проведен в ацетатном буфере с использованием ферментного комплекса, состоящего из ферментных препаратов «Целлолюкс-А» и «Брюзайм BGX».

Таблица 2

Ферментативный гидролиз необработанной биомассы
и обработанной твердой фракции

Температура, °C	Фактор тяжести, R	Продолжительность гидролиза, ч				
		8	24	40	56	72
		Выход РВ, %				
Необработанный мискантус	0,00	5,8	7,8	11,4	14,1	15,5
160	3,58	17,0	24,0	29,2	31,8	33,1
180	4,17	20,5	30,0	36,0	40,0	41,8
200	4,77	15,2	26,0	35,0	39,9	42,5
220	5,37	10,8	18,6	26,5	31,1	31,8

После гидролиза необработанной биомассы получена низкая концентрация РВ (выход после гидролиза 15,5% РВ через 72 ч). Проведенная обработка при уровне тяжести 3,58 (при температуре 180 °C) позволила при незначительном гидролизе гемицеллюлоз из твердой фракции (см. табл. 1) добиться увеличения выхода РВ после гидролиза в два раза с накоплением 33,1% после 72 ч (см. рис.). Результаты, полученные при гидролизе необработанной массы, представлены при факторе тяжести R 0,00.

Несмотря на то, что результат обработки при факторе тяжести 4,17 (при температуре 180 °C) обеспечил большее содержание целлюлозы (79,7%) и наибольшее присутствие глюкозы и ксилозы в жидкой фракции (16,5 г/л), низкий уровень предварительной обработки вызвал неполный гидролиз гемицеллюлоз с их остаточным содержанием 5,3% в твердой фракции. Результаты обработки, полу-

ченные при уровне тяжести 4,77 и температуре 200 °С, позволяют судить о более полном гидролизе гемицеллюлоз, но очевиден незначительный частичный гидролиз целлюлозы со снижением содержания до 73,2%. Снижение содержания гемицеллюлоз в предварительно обработанных твердых фракция при данных факторах тяжести привело к тому, что они показали высокую ферментативную усвояемость с накоплением РВ в диапазоне от 41,8 до 42,5%, с максимальным выходом при R 4,77. Такой рост выхода РВ объясняется увеличением доступности целлюлозы при удалении гемицеллюлоз, способствующим повышению пористости биомассы, следовательно, ферментативной усвояемости. Однако полученные после ферментативного гидролиза выходы РВ являются низкими и уступают данным по ферментативному гидролизу мискантуса после использования других видов предварительной обработки. Этот результат можно объяснить недостаточной доступностью целлюлозы для действия ферментов вследствие сохранения устойчивости структуры биомассы, что требует дополнительной проверки изменения морфологической структуры и кристалличности обработанных твердых фракций.

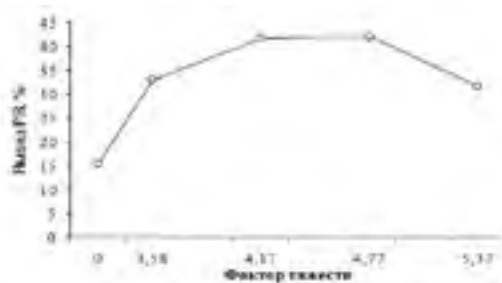


Рисунок 1. Ферментативный гидролиз твердых фракций

Ферментативный гидролиз твердых фракций

Гораздо больший эффект на результат ферментативного гидролиза может оказать присутствие лигнина в обработанных твердых фракциях. Как видно, повышение уровня тяжести обработки, связанное с ростом температуры со 180 до 220 °С, приводит к незначительной повторной полимеризации лигнина в сравнении с обработкой при факторе тяжести 3,58 (при 160 °С) и повышением его содержа-

ния до 26,85%, в то время как воздействие при уровне тяжести 4,77 (при 200 °C) сопровождается более интенсивной конденсацией лигнина со значительным ростом содержания до 35,8%. Дальнейшее увеличение температуры обработки до 220 °C при факторе тяжести 5,37 дает значительное накопление лигнина, удерживаемого в твердой фракции, до 44% (см. табл. 1). Этот факт ограничивает действие ферментов и приводит к снижению выхода редуцирующих веществ до уровня 31,8% при гидролизе твердых фракций, обработанных при температурах 200 и 220 °C. Присутствие конденсированного лигнина на поверхности целлюлозы препятствует доступу ферментов и ограничивает их действие (Pu et al., 2013).

Выводы. В представленной работе проведено исследование предварительной автогидролитической обработки мискантуса в горячей воде, находящейся в жидком состоянии. Проведена оценка влияния температуры обработки на изменение химического состава обработанных твердых фракций с помощью коэффициента тяжести. Результаты показали изменение химического состава твердых фракций, связанное со значительным снижением концентрации гемицеллюлоз при увеличении фактора тяжести обработки, что привело к заметному повышению ферментативной усвояемости биомассы с высоким выходом редуцирующих веществ в сравнении с исходной биомассой. Другим фактором, который также свидетельствует об изменениях, проходящих при гидротермической обработке, является изменение содержания целлюлозы в твердой фракции. Повышение тяжести обработки приводит к увеличению содержания целлюлозы относительно начального. Максимальное значение 79,7 %, присутствующее в твердой фракции, было достигнуто при 180 °C и уровне тяжести обработки R 4,17. Дальнейшее увеличение тяжести обработки, связанное с повышением температуры процесса, приводит к частичному гидролизу целлюлозы.

В результате ферментативного гидролиза получены данные по изменению накопления редуцирующих веществ. Снижение содержания гемицеллюлоз в предварительно обработанных твердых фракция привело к тому, что они показали высокую ферментативную усвояемость с накоплением редуцирующих веществ в диапазоне от 41,8 до 42,5 %, с максимальным выходом при факторе тяжести 4,77.

Невысокий результат по выходу редуцирующих веществ можно объяснить недостаточной доступностью целлюлозы для действия ферментов вследствие сохранения недоступности структуры биомассы, а также реакции конденсации лигнина со значительным ростом содержания до 44% при увеличении температуры обработки до 220 °C при факторе тяжести 5,37. В результате протекания процесса повторного осаждения лигнина ограничивается протекание ферментативного гидролиза целлюлозы, а накопление редуцирующих веществ сокращается до 31,8%.

Библиографический список

- Ballesteros I., Negro M., Oliva J.M., Cabanas A., Manzanares P., Ballesteros M. Ethanol production from steam explosion pretreated wheat straw // *Applied Biochemical Biotechnology*. 2006. V. 130. I. 1-3. P. 496–508. DOI: 10.1385/ABAB:130:1:496.
- Budaeva V.V., Skiba E.A., Baibakova O.V., Makarova E.I., Orlov S.E., Kukhlenko A.A., Udoratina E.V., Sakovich G.V., Shcherbakova T.P., Kuchin A.V. Kinetics of the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials at different concentrations of the substrate // *Catalysis in Industry*. 2016. T. 8, № 1. C. 81–87. DOI: 10.1134/S2070050416010025.
- DeMartini J.D., Pattahil S., Miller J.S., Li H., Hahn M.G., Wyman C.E. Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass // *Energy Environmental*. 2013. S. 6. I. 3. P. 898–909. DOI: 10.1039/C3EE23801F.
- Harun M.Y., Radiah A.B.D., Abidin Z.Z., Yunus R. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) // *Bioresource Technology*. 2011. V. 102. I. 8. P. 5193–5199. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.001.
- Kabel M.A., Bos G., Zeevalking J., Voragen A.G.J., Schols H.A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw // *Bioresource Technology*. 2017. V. 98. I. 10. P. 2034–2042. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.08.006.
- Kim K.H., Hong J. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocelluloses enhances enzymatic cellulose hydrolysis // *Bioresource Technology*. 2001. V. 77. I. 2. P. 139–144. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00147-4.
- Laser M., Schulman D., Allen S.G., Lichwa J., Antal M.J., Lynd L.R. A compar-

ison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for conversion to ethanol // *Bioresource Technology*. 2002. V. 81. I. 1. P. 33–44. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00103-1.

Leopoldo J. Rios-Gonzalez, Thelma K. Morales-Martinez, Maria F. Rodriguez-Flores, Jose A. Rodriguez-De la Garza, David Castillo-Quiroz, Agustin J. Castro-Montoya, Alfredo Martinez. Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse // *Bioresource Technology*. 2017. V. 242. P. 184–190. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.03.039.

Li Mi, Cao Shilin, Meng Xianzhi, Studer Michael, Wyman Charles E., Ragauskas Arthur J., Pu Yunqiao. The effect of liquid hot water pretreatment on the chemical–structural alteration and the reduced recalcitrance in poplar // *Biotechnology for Biofuels*. 2017. V. 10. P. 237. DOI 10.1186/s13068-017-0926-6.

Makarova E.I., Budaeva V.V., Skiba E.A., Sakovich G.V. Enzymatic hydrolysis of celluloses obtained via the hydrothermal processing of miscanthus and oat hulls // *Catalysis in Industry*. 2014. T. 6, № 1. C. 67–71. DOI: 10.1134/S2070050414010061.

Mc Williams R.C., van Walsum G.P. Comparison of aspen wood hydrolysates produced by pretreatment with liquid hot water and carbonic acid // *Applied Biochemical Biotechnology*. 2002. V. 98–100. I. 1–9. P. 109–121. DOI: 10.1385/ABAB:98-100:1-9:109.

Mesa L., Gonzalez E., Cara C., González M., Castro E., Mussattoc S.I. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse // *Chemical Engineering Journal*. 2011. V. 3. P. 168:1157–62. DOI: 10.1016/j.cej.2011.02.003.

Mosier N, Hendrickson R, Ho N, Sedlak M, Ladisch MR. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover // *Bioresource Technology*. 2005. V. 96. I. 18. P. 1986–1993. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.01.013.

Overend R.P., Chornet E., Gascoigne J. A. Fractionation of lignocelluloses by steam–aqueous pretreatments // *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 1987. V. 321. P. 523–536. DOI: 10.1098/rsta.1987.0029.

Pu Y., Hu F., Huang F., Davison B.H., Ragauskas A.J. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments // *Biotechnology for Biofuels*. 2013. V. 6. I. 1. P. 15. DOI: 10.1186/1754-6834-6-15.

- Rogalinski T, Ingram T, Brunner G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures // Journal of Supercritical Fluids. 2008. V. 47. I. 1 P. 54–63. DOI: 10.1016/j.supflu.2008.05.003.
- Skiba E.A., Budaeva V.V., Baibakova O.V., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V Dilute nitric-acid pretreatment of oat hulls for ethanol production // Biochemical Engineering Journal. 2017. T. 126. C. 118–125. DOI: 10.1016/j.bej.2016.09.003.
- Walsum G.P., Shi H. Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover // Bioresource Technology. 2004. V. 93. P. 217–226. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.11.009.
- Wan C., Zhou Y., Li Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility // Bioresource Technology. 2011. V. 102. I. 10. P. 6254–6259. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.075.

УДК 60.602.3

М.Ю. Парфенов, Е.С. Яценко, Б.П. Шипунов

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Хеморезистентность *Bacillus subtilis*

Проведено исследование хеморезистентности *Bacillus subtilis* ВКПМ В – 5449. В ходе исследования выявлено, что некоторые особи исследуемого вида выживают в растворах хлороводородной кислоты, вплоть до концентрированной, причем с увеличением концентрации кислоты процент выживаемости снижается. Также в ходе микроскопирования выяснено, что с повышением концентрации кислоты в растворе уменьшается количество бактерий, вышедших из споры.

Ключевые слова: хеморезистентность, *Bacillus subtilis* ВКПМ В – 5449, хлороводородная кислота, споры.

Применение различных штаммов *Bacillus subtilis* для синтеза биологически активных соединений в настоящее время очень

распространено. На основе *Bacillus subtilis* производят множество пробиотиков: Биоспорин, Споробактерин и т.д. Штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В – 5449, взятый для исследования, в ходе жизнедеятельности синтезирует сурфактин, который может использоваться для создания противокоагулирующих средств в медицине. Изучение поведения микроорганизмов в различных условиях – одна из важнейших задач, стоящих перед биотехнологией. Моделирование агрессивных условий дает производителю предсказуемость и надежность в обращении с тем или иным штаммом микроорганизма. Также данные представляют интерес для определенного круга исследователей.

При изучении кислотостойкости *Bacillus subtilis* ВКПМ В – 5449 в роли стрессового реагента использовался раствор хлороводородной кислоты. Было проведено три параллельных эксперимента и контрольный опыт. 0,1 г сухих спор в асептические условия помещали в 50 мл раствора соляной кислоты различной концентрации: концентрированная кислота (36 %) и её растворы в разведении 1:1 и 1:10. Через 5, 15, 30, 60 минут из раствора производился высев 0,01 мл на агаризованную питательную среду, следующего состава: (г/л): агар-агар – 18, дрожжевой экстракт – 5, пептон – 15, хлорид натрия – 5, дистиллированная вода – до 1 л (рН 6,8–7,0). Перед посевом готовые среды стерилизовали автоклавированием в течение 30 минут при давлении 1,1 кгс/см². Затем раствор был равномерно распределен по поверхности среды стерильным шпателем Дригальского. Культивировали в термостате в течение 24 часов при температуре 37 °С. Через сутки фиксировали численность колоний методом прямого подсчета. Было проведено микрокопирование спор, находящихся в растворе в течение 30 минут. В контрольном опыте вместо кислоты использовали стерильную воду. Численность микроорганизмов в контрольном опыте определялась стандартным методом десятикратных разведений.

В ходе исследования были получены следующие результаты, представленные в таблицах и на рисунке.

Таблица 1

Среднее значение колоний, полученное в результате экспериментов

Показатель	Время			
	5 минут	15 минут	30 минут	60 минут
HCl (36%), КОЕ*102	100±20	119±30	4±3	33±9
Раствор, разведение1:1, КОЕ*102	23±10	226±36	118±33	143±29
Раствор, разведение 1:10, КОЕ*102	1272±100	311±50	296±30	45±20
Контрольный опыт, КОЕ/0,1 г * 109				380±20

Таблица 2

Процент выживания в растворах в разное время

Показатель	Время			
	5 минут	15 минут	30 минут	60 минут
HCl (36%)	2,6*10-6	3,1*10-6	0,1*10-6	0,8*10-6
Раствор, разведение1:1 (18%)	0,6*10-6	5,9*10-6	3,1*10-6	3,7*10-6
Раствор, разведение 1:10 (3,6%)	33,4*10-6	8,2*10-6	7,8*10-6	1,2*10-6

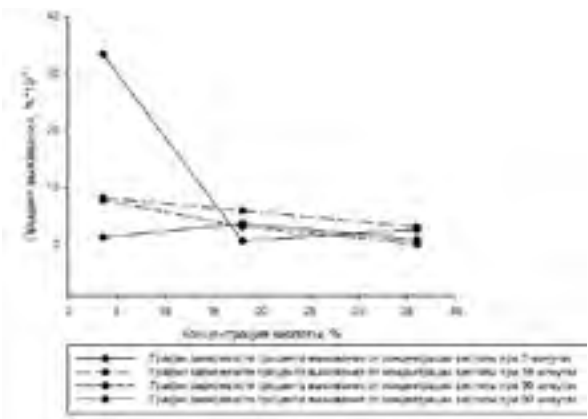


График зависимости процента выживания от концентрации кислоты

Итак, из общего числа бактерий максимальный процент выживания составил $33,4 \cdot 10^{-6} \%$ при минимальной концентрации (1:10) и минимальном времени (5 мин). С повышением концентрации кислоты уменьшается процент выживания до $0,1 \cdot 10^{-6}$ в течение 30 мин. Микроскопирование споровых суспензий показало, что со снижением концентрации также уменьшается число бактерий, вышедших из споры.

УДК 577.15

А.В. Пилигаев¹, Ю.В. Самойлова¹, К.Н. Сорокина^{1,2}, В.Н. Пармон^{1,2}

¹ Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН

(Новосибирск, Россия)

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (Новосибирск, Россия)

Разработка продуцента эстеразы бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* и ее применение в биотехнологии *

В данной работе проведено клонирование и коэкспрессия эстеразы бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* с молекулярными шаперонами в *E. coli*, которая привела к увеличению продукции фермента. Эстераза estUT1 отличалась активностью при pH 8,0 и температуре 70–80 °C, стабильностью в присутствии органических растворителей, специфичностью в отношении субстратов с короткоцепочечными остатками жирных кислот, высокой каталитической эффективностью в отношении малатиона и стереоспецифичностью к (S)-энантиомеру при разделении рацемической смеси этиловых эфиров кетопрофена. На основе эстеразы методом поперечной сшивки агрегатов белка был получен биокатализатор CLEA-estUT1. Данный биокатализатор был протестирован в реакции гидролиза органофосфорного инсек-

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-38-00386 мол_а.

тицида малатиона и показал высокую операционную стабильность (время полуинактивации составило 1155 ч). Высокая стабильность биокатализатора делает его перспективным для применения в биотехнологических процессах, основанных на реакциях гидролиза сложных эфиров.

Ключевые слова: эстераза, иммобилизация, коэкспрессия, шапероны, малатион, кетопрофен.

Бактериальные термостабильные эстеразы нашли широкое применение в современных технологических процессах, в том числе в химической, пищевой и фармацевтической промышленности. Ключевыми показателями, определяющими эффективность использования эстераз в качестве активного компонента биокатализатора в промышленности, являются специфичность фермента, термостабильность и устойчивость по отношению к денатурирующим условиям, так как многие процессы протекают при высоких температурах и в присутствии органических растворителей. Главным недостатком использования ферментов в качестве биокатализаторов реакций является их высокая стоимость, связанная с низкой экспрессией белка и, соответственно, с затратами на его выделение и очистку. Низкая экспрессия фермента может быть вызвана несколькими причинами, включая высокую токсичность белка для клеток, инактивацию белка и его выделение в виде телец включения вследствие его внутриклеточной агрегации. Одним из путей повышения продукции фермента является совместная экспрессия с шаперонами, которая предотвращает агрегацию белка и увеличивает его выход в растворимой фракции.

Для применения в различных биотехнологических процессах, помимо высокой активности, фермент должен обладать достаточной стабильностью в денатурирующих условиях (рН, температура, присутствие органических растворителей). Иммобилизация ферментов позволяет значительно увеличить этот показатель за счет образования дополнительных взаимодействий (водородных и ковалентных связей) в структуре фермента. Существует множество методов иммобилизации, основанных на физической адсорбции фермента

на носителе, ковалентном связывании фермента между собой или с носителем, а также на включении фермента в структуру носителя (Mohamad et al., 2015). Метод поперечной сшивки ферментных агрегатов (ПСФА) имеет множество преимуществ как метод иммобилизации, так как он совмещает очистку, осаждение и иммобилизацию фермента в один этап, тем самым упрощая и снижая стоимость процесса получения биокатализатора. Биокатализаторы, полученные методом поперечной сшивки, обладают высокой активностью и стабильностью в широком диапазоне значений pH, температур, в присутствии органических растворителей. Биокатализаторы такого типа применяются в различных биотехнологических процессах, включая получение биодизельного топлива и синтез химических соединений.

Целью данной работы было получение и изучение свойств рекомбинантной термостабильной эстеразы, разработка подхода для увеличения продукции этой эстеразы и приготовление на ее основе биокатализатора для исследования в реакции гидролиза инсектицида малатиона.

Материалы и методы исследования. Ген эстеразы бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* клонировали в составе в экспрессионного вектора pET32b(+). Коэкспрессию эстеразы estUT1 с молекулярными шаперонами *E. coli* (KJE, ClpB и ELS) или триггерным фактором (TF) *Devosia psychrophila* проводили путем индукции ИПТГ клеток *E. coli* BL21(DE3) (de Marco et al., 2007). Эстеразу выделяли в виде растворимой фракции белка с последующей очисткой с помощью аффинной хроматографии. Полученный белок использовали для приготовления биокатализатора CLEA-estUT1 методом образования поперечно-сшитых ферментных агрегатов, полученных осаждением сульфатом аммония с последующей сшивкой глутаровым альдегидом; в качестве добавки использовали БСА. Оптимизацию условий приготовления биокатализатора проводили с использованием метода отклика поверхности (RSM). Активность estUT1 и CLEA-estUT1 определяли спектрофотометрически (OD_{405} нм) с использованием эфиров карбоновых кислот п-нитрофенола в качестве субстратов (Eom, Song, Ahn, Seo, & Rhee, 2005). Степень иммобилизации (*ImD*) определяли как отношение активности биокатализатора к активности фермента, используемого для его приготовления (Kim et al., 2013). Гидролиз малатиона (начальная концентрация 27,5 мг/л) проводили

в 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 при 37 °С в течение 25 циклов (каждый цикл 24 ч). Разделение 5 мМ этиловых эфиров кетопрофена проводили в 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 с добавлением 0,3% Тритон X-100 при 50 °С в течение 24 ч.

Результаты и их обсуждение. Эстераза estUT1 была получена клонированием гена эстеразы бактерии *U. thermosphaericus* в плазмиду pET32b(+) с использованием эндонуклеаз рестрикции BamHI и Sfr 274I. Выход estUT1 в растворимой фракции с 1 мг белка после совместной экспрессии с шаперонами *E. coli* и TF *D. psychrophila* составил $22,6 \pm 1,3$ и $25,2 \pm 0,8$ ЕА соответственно, по сравнению с $15,6 \pm 0,2$ ЕА для эстеразы, экспрессированной без шаперонов.

Исследование свойств эстеразы показало, что фермент имеет оптимум активности при pH 8,0 и 70-80 °С, предпочтительно гидролизует субстраты с короткоцепочечными остатками жирных кислот (C2–C8) с максимальной активностью для pNPC2. Фермент отличается стабильностью в органических растворителях: 10 и 30% растворы метанола, этанола, н-гексана, ацетона и ДМФА не оказывают влияния на активность фермента. Исследование кинетических параметров выявило высокую каталитическую эффективность фермента по отношению к малатиону (О,О-диметил-S-(1,2-дикарбэтоксипропан) дитиофосфат) $k_{cat}/K_M = 835,5 \pm 58,7$ л/с×мМ. Также фермент оказался стереоспецифичен, и в реакции разделения этиловых эфиров кетопрофена энантиомерный избыток (S)-кетопрофена составил 35,3%.

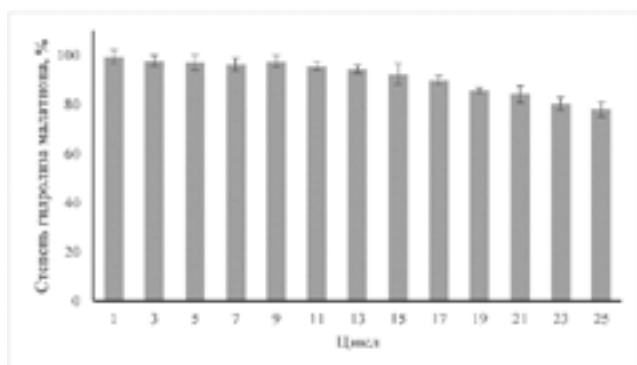
Биокатализатор (CLEA-estUT1) на основе эстеразы estUT1 был получен в виде поперечносшитых ферментных агрегатов в оптимальных условиях. Для описания процесса приготовления биокатализатора была разработана модель второго порядка, представленная следующим уравнением:

$$ImD (CLEA-estUT1) = 66.18 + 4.74A + 6.70B + 7.78C + 13.84D + 3.28AB + 2.12AC + 0.50AD + 0.45BC + 1.13BD - 0.47CD - 23.67A^2 - 10.69B^2 - 7.42C^2 + 7.32D^2,$$

где A – время иммобилизации; B – концентрация сульфата аммония; C – концентрация глутарового альдегида; D – концентрация БСА.

На основе полученной модели оптимальными условиями для приготовления CLEA-estUT1 являются: время иммобилизации – 5,1 ч, сульфат аммония – 65,1% (вес./об.), глutarовый альдегид – 120,6 (вес./об.) и БСА – 0,2 мМ (вес./об.). Предсказанное с помощью разработанной модели значение *ImD* в оптимальных условиях равное 91,3% согласуется с полученным экспериментальным значением ($90,6 \pm 2,7\%$). Удельная активность полученного в оптимальных условиях биокатализатора CLEA-estUT1 составила $29,4 \pm 0,5$ ЕА/мг биокатализатора.

Исследование операционной стабильности CLEA-estUT1 в реакции гидролиза малатиона в 50 мМ Tris-HCl pH 7,0 при 37 °C (рис.) показало высокую эффективность биокатализатора на протяжении всего времени эксплуатации.



Операционная стабильность CLEA-estUT1 в реакции гидролиза малатиона в течение 25 циклов

Степень гидролиза малатиона после первого цикла реакции была $99,4 \pm 2,8\%$, после 25-го составила $78,1 \pm 3,1\%$. Время полуинактивации биокатализатора в исследуемых условиях – 1155 ч.

Выводы. Таким образом, в работе была клонирована и экспрессирована в *E. coli* новая термостабильная эстераза estUT1 бактерии *U. thermosphaericus*. Было показано увеличение продукции эстеразы в растворимой фракции путем коэкспрессии с молекулярными шаперонами *E. coli* и TF *D. psychrophila*. Исследование свойств эстеразы выявило ее рН и температурный оптимумы (8,0 и 70–80 °C со-

ответственно), высокую стабильность в присутствии органических растворителей, специфичность к субстратам с короткой длиной алкильной цепи (C2-C8) и малатиону, а также стереоспецифичность в отношении (S)-энантиомера при разделении рацемической смеси этиловых эфиров кетопрофена. Благодаря своим разнообразным свойствам эстераза estUT1 является перспективным ферментом для применения в биотехнологических процессах. На основе estUT1 был получен биокатализатор в виде поперечносшитых ферментных агрегатов и исследован в реакции гидролиза органофосфорного инсектицида малатиона в водном растворе. Биокатализатор CLEA-estUT1 показал высокую операционную стабильность на протяжении 25 циклов гидролиза малатиона, сохраняя степень гидролиза малатиона выше $78,1 \pm 3,1\%$. Полученный результат говорит о перспективности исследований бактериальных ферментов и биокатализаторов на их основе для биотехнологических приложений.

Библиографический список

- De Marco A., Deuerling E., Mogk A., Tomoyasu T., Bukau B. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli* // BMC Biotechnology. 2007. №7. P. 32–32. DOI: 10.1186/1472-6750-7-32.
- Eom G.T., Song J.K., Ahn J.H., Seo Y.S. Rhee, J.S. Enhancement of the Efficiency of Secretion of Heterologous Lipase in *Escherichia coli* by Directed Evolution of the ABC Transporter System // Applied and Environmental Microbiology. 2005. № 71(7). P. 468–474. DOI: 10.1128/AEM.71.7.3468-3474.2005.
- Kim M. H., Park S., Kim Y. H., Won K., Lee S.H. Immobilization of formate dehydrogenase from *Candida boidinii* through cross-linked enzyme aggregates // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2013. № 97 (Supplement C). P. 209-214. DOI: [https:// ; DOI: org/10.1016/j.molcatb.2013.08.020](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.08.020).
- Mohamad N.R., Marzuki N.H.C., Buang N.A., Huyop F., Wahab R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes // Biotechnology, Biotechnological Equipment. 2015. № 29(2). P. 205-220. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192.

УДК 663.1

А.Ю. Просеков¹, Т.В. Вобликова²

¹Кемеровский государственный университет (Кемерово, Россия)

*²Ставропольский государственный аграрный университет
(Ставрополь, Россия)*

Микрокапсулирование бифидобактерий и их применение в производстве пищевых продуктов

Рассмотрена возможность повышения жизнеспособности бифидобактерий путем микрокапсулирования в матрицу биodeградируемого нетоксичного природного полимера, особенности свойств альгинатных гелей, физико-химические показатели альгината натрия и альгината калия. Представлены результаты исследований, направленных на повышение стабильности пробиотиков, инкапсулированных в альгинатном геле методом экструзии. Представлены результаты морфологических исследований микрокапсул. Морфологические характеристики микрочастиц определяли при помощи оптической и сканирующей электронной микроскопии. Анализ размеров частиц выполняли также с применением сканирующей электронной микроскопии. Исследуемый образец перед проведением исследования должен быть высушен, что приводило к потере сферической формы микрокапсул. Морфология высушенных вымораживанием микрочастиц, исследованных с помощью сканирующей электронной микроскопии, показала высокую агломерацию среди частиц и разнообразие их распределения по размерам для обеих обработок. Микрочастицы, содержащие резистентный крахмал, были более агломерированы по сравнению с микрочастицами альгината. При помощи оптической микроскопии была исследована внутренняя часть микрокапсул. Проведенное исследование показало наличие бифидобактерий заключенных в структуре микрокапсул. Использование резистентного крахмала в сочетании с альгинатом оказывает синергическое действие на гелеобразование, обеспечивая дополнительную защиту пробиотических клеток. Иммобилизация бифидобактерий в микрокапсулах играет важную роль при внесении бифидобактерий

в пищевые продукты, так как позволяет сохранить их полезные свойства. Микрокапсулирование способствует сохранению количества жизнеспособных клеток при отрицательном действии желудочного сока, желчи и внешних условий, что приводит к повышению пробиотических свойств продуктов.

Ключевые слова: микрокапсулирование, бифидобактерии, пищевые продукты, йогурт, овечье молоко.

Введение. Введение пробиотических бактерий в качестве нутрицевтиков – это область, которая характеризуется быстрым ростом за последние годы, а глобальный рынок оценивается в 32,6 млрд долларов.

Пробиотические микроорганизмы включены в самые разнообразные продукты, добавки и фармацевтические препараты для поддержания здоровья и хорошего самочувствия человека. Однако сохранение жизнеспособности бактериальных клеток во время хранения и транзита через желудочно-кишечный тракт остается проблемой. Инкапсуляция бифидобактерий в частицы гидрогеля пищевого качества потенциально снижает их чувствительность к стрессам окружающей среды. Большая часть этой технологии основана на иммобилизации бактерий в полимерную матрицу, которая сохраняет свою структуру в желудке до разложения и растворения в кишечнике.

Функциональные продукты, содержащие пребиотики и пробиотики, являются частью новой рыночной ниши, которая направлена на признание потребителями, удовлетворение спроса и принятие ее. В настоящее время потребители большое внимание уделяют питанию и качеству пищи, которую они едят, тем самым увеличивая спрос на «здоровую» пищу. В связи с этим актуальным является обеспечение населения нутриентами для поддержания здоровья и трудоспособности на высоком уровне путем разработки обогащенных продуктов и использования их для регулярного питания.

При этом важным является применение достаточно новых направлений в технологии обогащенных молочных продуктов, таких как нано- и биотехнологии. Биополимерные нано- и микрочастицы, изготовленные из белков или полисахаридов, могут быть использо-

ваны в качестве систем доставки или для модуляции физико-химических и сенсорных характеристик пищевых продуктов. Разработанная коллоидная система твердых частиц находит все более широкое применение в пищевой промышленности для применения в качестве инкапсулирующих систем или модуляции физико-химических и сенсорных свойств пищевых продуктов. Чтобы быть коммерчески жизнеспособными, эти системы должны полностью состоять из пищевых ингредиентов с использованием экономически доступных компонентов и надежных операций при их обработке. Одним из наиболее перспективных путей получения коллоидных частиц пищевого класса является создание частиц биополимера из белков и / или полисахаридов.

Материалы и методы исследований. При выполнении работы использовали общепринятые стандартные и оригинальные методы исследования.

Получение микрокапсул. Микрочастицы были получены в соответствии с технологией экструзии. Для этого аэрограф (размер сопла 0,3 мм, модель EW 110) соединялся с воздушным компрессором (модель Jas – 1203) с давлением воздуха 2,55 кгс/см² и высотой 30 см между распыляющим соплом и CaCl₂. Были приготовлены два раствора, содержащие 1% альгината натрия, первый из них содержит только альгинат натрия, а второй – альгинат натрия + 1% пребиотического Hi. После полной дисперсии полимеров добавляли *Bifidobacterium animalis* AC-1540, штаммы и растворы распыляли в 0,1 М CaCl₂.

Частицы перемешивали в течение 30 мин в растворе CaCl₂ для обеспечения полного гелеобразования, а затем удаляли из раствора с использованием стерилизованного сита (50 мкм), промывая стерильной дистиллированной водой на аналитическом сите (размер ячейки 500 мкм, нерж). Влажные микрочастицы хранились в стерильных флаконах с крышками (влажные микрочастицы альгината натрия, влажные микрочастицы альгината натрия + Hi-maize), а оставшаяся часть лиофилизировалась лиофильным лиофилизатором (модель L101) для 24 ч, впоследствии хранилась в стерильных флаконах с крышками (высушенные вымораживанием микрочастицы альгината натрия, высушенные вымораживанием микрочастицы альгината натрия + Hi-maize).

После приготовления растворов их подвергали фильтрации для удаления нерастворенных компонентов и примесей. Далее лиофилизированные бифидобактерии, содержащие в 1 г культуры 1011 живых клеток, с массовой долей влаги $5,4 \pm 0,32$ %, направляли на процесс диспергирования при температуре плюс 4 ± 2 °C с нетоксичной суспензией полимера в соотношении 1,0:12,0 по общей массе. Далее осуществляли осаждение образованных микрокапсул и фильтрование. После фильтрования микрокапсулы направляли на промывание и сушку.

Исследование микроструктуры микрокапсул. Общую морфологию микрокапсул определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа (SEM; JEOL-JSM-5410LV, Япония). Микрокапсулы помещали на подложку столика микроскопа с помощью двухсторонней ленты, покрытой золотым напылением. Ускоряющее направление микроскопа 5 кВ, токзонда 6-Ю-6 А. Диаметры микрокапсул определяли с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США), средний диаметр – путем измерения 100 микрокапсул.

Результаты и их обсуждение. Выбор полимерной основы как оболочки создает благоприятные условия для формообразования микрокапсул в широком диапазоне размеров, степени упаковки, молекулярной массы, структуры и формы, что обеспечивает трансфер и целевую доставку в желудочно-кишечный тракт жизнеспособных пробиотических микроорганизмов в матрице пищевых продуктов (Homaouni et al., 2007).

При микрокапсулировании пробиотиков следует учитывать химическую природу материалов покрытия. Примененные методы микрокапсулирования повышают жизнеспособность пробиотиков как внутри пищевых продуктов, так и во время их прохождения через желудочно-кишечный тракт. Однако материалы покрытия ведут себя по-разному, поэтому их способность защищать живые микроорганизмы и доставлять биологически активные вещества также варьируется (Ghost, 2006). Кроме того, эффективность любого материала зависит не только от его способности к капсулированию, прочности и повышения жизнеспособности, а также от дешевизны, доступности и биосовместимости (Shah, Ravula, 2000).

Особенности свойств альгинатных гелей делают возможным его использование для герметизации эукариотических и прокариотиче-

ских клеток. Микрогерметизация с одним только альгинатным гелем была оценена как возможный метод для улучшения жизнеспособности пробиотиков во время воздействия низкого pH и в процессе хранения продукта.

Альгиновая кислота – полисахарид, вещество резиноподобной консистенции, выделяемое из красных, бурых и некоторых зелёных водорослей. В ламинарии японской (лат. *Laminaria japonica*) содержание альгиновой кислоты находится в пределах 15–30%. В воде и многих органических растворителях кислота не растворяется. Использование альгиновой кислоты как загустителя объясняется ее способностью поглощать 300 массовых частей воды. Альгиновые кислоты извлекают из водорослей обработкой раствором щёлочи. Полученный раствор альгината очищают. В товарном продукте могут содержаться примеси, попадающие из водорослей и морской воды.

Альгиновая кислота состоит из двух остатков полиуроновых кислот (D-маннуровой и L-гулуровой). Соли альгиновой кислоты не перевариваются организмом человека и выделяются через кишечник. Соединения альгиновой кислоты в качестве загустителей используются в пищевой промышленности и как компонент лекарственных препаратов в медицине.

Альгинат натрия состоит из остатков маннуровой и гулуровой кислот, связанных за счет 1,4-β-гликозидных связей, с небольшими разветвлениями. Водород в карбоксильных группах замещён на калий. Соотношение маннуровой : гулуровой кислоты в зависимости от вида водорослей меняется от 1:1,04 до 1:1,9. Формула альгината натрия представлена на рисунке 1.

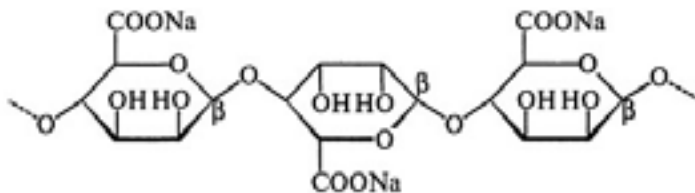


Рис. 1. Формула альгината натрия

Альгинат натрия выпускается в виде желтоватого волокнистого порошка, гранул или пластинок. Отсутствие аллергенных свойств, выведение солей тяжелых металлов и радионуклидов объясняет широкое использование альгината натрия. Соединение не вызывает раздражения слизистых оболочек и кожных покровов при контакте. В таблице представлены физико-химические показатели биополимеров.

Физико-химические показатели биополимеров

Образец биополимера	Показатели				
	оптимальный диапазон рН	условия гелеобразования	продолжительность растворения, не более (мин)	массовая доля влаги, не более (%)	массовая доля золы, не более (%)
Альгинат калия	4,7–6,3	воздействие гелеобразующих ионов	12,0	10,0	23,0–25,0
Альгинат натрия	4,5–6,5	воздействие гелеобразующих ионов	12,0	10,0	18,0–22,0

Таким образом, анализ физико-химических свойств, представленных в таблице, позволяет сделать вывод о том, что исследуемые образцы биологических полимеров можно использовать для процесса иммобилизации бифидобактерий.

Выбранная техника иммобилизации оказывает большое влияние на жизнеспособность ассоциированных пробиотических бактерий.

Иммобилизация бифидобактерий в альгинате защищает их от агрессивных внешних факторов. Резистентный крахмал представляет собой фракцию крахмала, устойчивую к перевариванию, ее можно ферментировать здоровой микрофлорой в толстой кишке. Резистентный крахмал обладает привлекательными характеристиками, извлечен из природного источника и обладает мягким вкусом.

Были проведены исследования, направленные на повышение стабильности пробиотиков, инкапсулированных в альгинатном геле методом экструзии. Таким образом, были исследованы микро-

капсулы, содержащие резистентный крахмал в структуре микрокапсулы и без него. Высушенные и увлажненные микрокапсулы оценивали для количественного определения их среднего диаметра и распределения по размерам, а также характеризовали их морфологию.

Разработанный способ получения микрокапсул на основе биодиградируемых нетоксичных полимеров природного происхождения позволяет получить микрокапсулы с замкнутой поверхностью и заданных размеров. Для определения микроструктуры поверхности микрочастиц применяли сканирующий растровый электронный микроскоп (РЭМ) Tescan высокого разрешения серии MIRA. Анализ данных, полученных в результате исследований, проведенных при помощи сканирующего растрового электронного микроскопа (РЭМ) Tescan, свидетельствует о том, что капсулы имеют конфигурацию, близкую к сферической форме, без микротрещин и разрывов, что позволяет обеспечить достаточный уровень защиты бифидобактерий от воздействия агрессивных факторов желудочно-кишечного тракта. Характеристика размера частиц важна при разработке способа и технологических параметров получения размеров микрочастиц в оптимальном диапазоне. Морфологические характеристики микрочастиц определяли при помощи оптической и сканирующей электронной микроскопии. Анализ размеров частиц выполняли также с применением сканирующей электронной микроскопии. Перед проведением исследования образец должен быть высушен, однако это приводит к потере сферической формы микрокапсул. Снимки, полученные в результате применения сканирующего растрового электронного микроскопа, представлены на рисунке 2.

Морфология высушенных вымораживанием микрочастиц, исследованных с помощью сканирующей электронной микроскопии, показала высокую агломерацию среди частиц и разнообразие распределения частиц по размерам для обеих обработок. Микрочастицы, содержащие резистентный крахмал, были более агломерированы по сравнению с микрочастицами альгината.

При помощи оптической микроскопии была исследована внутренняя часть микрокапсул. Проведенное исследование показало

наличие бифидобактерий, заключенных в структуру микрокапсул. Использование резистентного крахмала в сочетании с альгинатом оказывает синергическое действие на гелеобразование, обеспечивая дополнительную защиту пробиотических клеток.

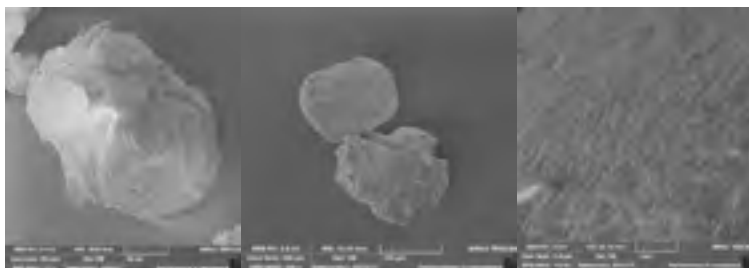


Рис. 2. Морфология и микроструктура высушенных микрочастиц из альгината и вспомогательного природного полимера, полученных методом сканирующей электронной микроскопии

Выводы. Функциональные характеристики биополимерной частицы в конечном счете зависят от ее состава, физико-химических свойств и структурных характеристик. Поэтому интерес представляют наиболее важные характеристики частиц биополимера и их связь с физико-химическими и сенсорными свойствами пищевых продуктов.

Представляется перспективным проведение исследований по использованию методов иммобилизации клеток бифидобактерий, а также их применению при разработке обогащенных молочных продуктов из козьего и овечьего молока.

Иммобилизация бифидобактерий в микрокапсулах играет важную роль при внесении бифидобактерий в пищевые продукты, так как позволяет сохранить их полезные свойства. Микрокапсулирование способствует сохранению количества жизнеспособных клеток при отрицательном действии желудочного сока, желчи и внешних условий, что приводит к повышению пробиотических свойств продуктов.

Одним из продуктов, производство которого осуществляется на основе инкапсулированных пробиотических бактерий, является йогурт. Выполненные исследования доказывают, что уровень

выживаемости бактерий, содержащихся в свободной форме в йогуртах, весьма низкий, меньше, чем рекомендуемое ежедневно потребление. По результатам анализа различных коммерческих йогуртов выявлено, что большинство йогуртов содержат весьма низкое количество этих микроорганизмов, особенно штаммов рода *Bifidobacteria*. Микрокапсулирование бактерий позволяет не только увеличить выживаемость бактерий, но также улучшить консистенцию и текстуру йогурта. Известно, что материал капсул, используемый для микрокапсулирования, также имеет важное значение как для выживаемости пробиотических культур, так и для свойств йогурта. Таким образом, применение иммобилизации протеолитических бактерий при помощи микрокапсулирования является актуальным и способствует повышению выживаемости микробных культур.

Библиографический список

- Ghost S.K. Functional Coatings: by Polymer Microencapsulation. Willey-VCH Verlag Gmbh & CoKGaA: Weinheim, 2006. 378 p.
- Homayouni A., Ehsani M.R., Aziz A., Razavi S.H., Yarmand M.S. An introduction to functional dairy foods // Proceedings of the First National Functional Food Congress. 2007. P. 60.
- Shah N.P., Ravula R. R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts // Australian Journal of Dairy Technology. 2000. №55. P. 139–144.

УДК 60:577.11:577.15

**В.В. Ревин, Д.А. Кадималиев, Н.А. Пестов, Е.В. Лияськина,
Н.А. Атыкян, Н.В. Новокупцев**

*Национальный исследовательский Мордовский государственный
университет им. Н.П. Огарёва (Саранск, Россия)*

Разработка перспективных функциональных и конструкционных биокомпозиционных материалов на основе микробных полисахаридов *

Оптимизированы условия биосинтеза бактериальной целлюлозы, левана и ксантана культивированием селекционированных штаммов – продуцентов на отходах биотехнологических производств. Разработаны технологии производства биокомпозитных материалов на основе микробных полисахаридов – бактериальной целлюлозы (в виде нанокристаллической целлюлозы, гелевых пленок и аэрогелей) и левана. Исследованы свойства функциональных и структурных биокомпозитных материалов, в том числе и прессованных материалов из древесных отходов.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, ксантан, леван, биокомпозиционные материалы, *Xanthomonas campestris* BKM B-2373D, *Gluconacetobacter sucrofermentans* H-110, *Azotobacter vinelandii* BKПМ D-08.

Введение. Создание биоразлагаемых материалов на основе смесей природных полимеров, которые могли бы под действием окружающей среды распадаться на безвредные для природы вещества, является одной из приоритетных задач современности. В этом плане особый интерес вызывают полимеры, полученные из биорганических соединений – полисахаридов и белков. Из них

* Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания 07 08 0210059 611, а также Министерства образования и науки Российской Федерации, проект госзадания №11.10882.2018/11.12 «Разработка материалов нового поколения в виде аэрогеля на основе целлюлозы, обладающих сверхнизкой теплопроводностью, плотностью и высокими шумопоглощающими свойствами».

можно получать упаковочные изделия, композиционные материалы, пленки, которые можно использовать в строительстве, сельском хозяйстве, медицине, пищевой и текстильной промышленности (Briassoulis, 2004, Kadimaliev et al., 2015; Revin et al., 2016). Широкое применение нашли такие микробные полисахариды, как ксантан, альгинат, леван, декстран, бактериальная целлюлоза и др. (Ревин и др., 2014; Лияськина и др., 2010). Они используются в медицине, фармацевтической, пищевой, химической и текстильной промышленности, в гидрометаллургии, технике, при добыче нефти и в ряде других областей народного хозяйства. Микробные полисахариды являются перспективным источником получения различных биокomпозиционных материалов широчайшего спектра, свойств и назначений. Особое внимание исследователей привлекает бактериальная целлюлоза (БЦ), которая обладает такими уникальными свойствами, как высокая механическая прочность, сорбционная способность, биологическая совместимость и т.д. (Ревин и др., 2014).

Материалы и методы исследования. Бактериальную целлюлозу получали культивированием в статических и динамических условиях в плоских контейнерах на мелассной среде (24 г/л по сахарозе), pH – 6,5.

Для получения биокomпозиционного материала высушенную и измельченную бактериальную целлюлозу смешивали с полиэтиленом в лабораторном смесителе HAAKE PolyLab Rheomix 600 OS с роторами Roller при температуре 150 °C, далее прессовали для получения пленки.

Нанокристаллическую целлюлозу из бактериальной целлюлозы получали методом кислотного гидролиза, аэрогели – методом лиофильного высушивания криогеля бактериальной целлюлозы.

Биопластики из отходов древесины получали методом горячего прессования в термогидравлическом прессе Gotech-7014-A50 (Gotech Testing Machines Inc., Тайбэй, Тайвань).

Механические свойства материалов – прочность на разрыв, относительное удлинение, прочность при изгибе – измеряли с помощью машины Labthink PARAM XLW (PC) auto tensile tester (Taiwan-USA), универсальной испытательной машине Gotech AI-7000M (Gotech Testing Machines Inc., Тайбэй, Тайвань), также толщину пле-

нок с помощью Labthink PARAM CHY-C2 thickness tester (Taiwan-USA). Структуру материалов исследовали с помощью ИК-спектроскопии IRPrestige-21 (Shimadzu, Japan), атомно-силовой микроскопии SPM 9600 (Shimadzu, Japan).

Результаты и их обсуждение. Получены высокопродуктивные штаммы бактерий *Xanthomonas campestris*, образующие ксантан в количестве 26–28 г/л, *Leuconostoc mesenteroides*, образующие декстран в количестве 40–50 г/л, новые продуценты бактериальной целлюлозы, образующие до 7 г/л биополимера: *Gluconacetobacter sucrofermentans* B-11267 – выделен из чайного гриба с последующей селекцией и идентифицирован с помощью анализа 16S рПНК (Ревин, Лияскина, 2014) и *Komagataeibacter hansenii* C-110 – выделен из индийского риса с последующей селекцией и идентифицирован с помощью анализа 16S рПНК.

Подобраны оптимальные условия культивирования продуцентов, обеспечивающие максимальное накопление полисахаридов. Разработаны технологии производства ксантана, декстрана и бактериальной целлюлозы с использованием дешевых отходов промышленности (Ревин и др., 2014; Богатырева и др., 2016; Сапунова и др., 2016; Revin et al., 2018).

Были получены гель-пленки бактериальной целлюлозы. После соответствующей модификации их использовали для иммобилизации лекарственных препаратов. В частности, получены и исследованы биокомпозиты с антибактериальной активностью на основе пленок БЦ и фузидовой кислоты (Ревин и др., 2015, Liyaskina et al., 2017). Показано, что они имеют высокую антибиотическую активность в отношении *Staphylococcus aureus* и могут быть использованы в медицине в качестве раневых покрытий.

Нанокристаллическая целлюлоза из бактериальной целлюлозы была получена методом кислотного гидролиза (Котина и др., 2015). Длина нанокристаллической целлюлозы, полученной нами из бактериальной целлюлозы, достигала 3–4 мкм. Данная нанокристаллическая целлюлоза использовалась для получения нанокомпозитных пленок на основе пектиновых веществ свекловичного жома (Ревин, 2014). Добавление нанокристаллической бактериальной целлюлозы к пектиновым пленкам в количестве 0,1; 1 и 5% приводило к увели-

чению прочности на разрыв на 54; 93 и 100%, соответственно (Ревин, Пестов, 2014).

Аэрогели из бактериальной целлюлозы, полученные методом лиофильного высушивания криогеля бактериальной целлюлозы, имели плотность от 4 до 20 кг/м³. Прочностные свойства аэрогелей зависят от плотности материала и однородности пористой структуры аэрогелей. Наибольшую прочность имел образец аэрогеля с плотностью 20,55 кг/м³. Анализ микропористой структуры позволяет заключить, что аэрогели с более высокой плотностью обладают более однородной пористой структурой. Например, аэрогель с плотностью 20,55 кг/м³ имел средний размер пор от 80 до 150 мкм. Самые крупные поры достигали диаметра 300 мкм. Полученный материал обладает крайне низкой теплопроводностью, которая сопоставима с теплопроводностью воздуха.

Также были получены пленки технического назначения на основе полиолефинов с добавлением сухой, измельченной на вариопланетарной мельнице до размеров менее 50 мкм, нативной и модифицированной фенолформальдегидными смолами бактериальной целлюлозы. Полученные пленки показали более высокую прочность по сравнению с полиолефиновой пленкой без добавок – в среднем на 15,2%.

Разработана технологическая схема получения прессованных композиционных материалов из отходов древесины с добавлением левана в качестве связующего (Revin et al., 2016). Полученные материалы по своим параметрам не уступают традиционным материалам на основе токсичных фенолформальдегидных смол. Физико-механические характеристики материалов зависели от количества и вязкости связующего, а также от условий его получения. Добавление левана положительно влияло на характеристики прессованных материалов. Прочность на растяжение при статическом изгибе лучших образцов полученных материалов составляла порядка 24–29 МПа, плотность – 1170–1250 кг/м³, а водопоглощение – около 7%. При горячем прессовании в FTIR-спектрах заметные изменения наблюдаются при частотах, характерных для сульфогрупп лигносульфоната, фруктозных остатков левана и скелетных колебаниях сиригильного и гваяцильного ядер в лигнине, а также C-H-групп гемицеллюлоз. Это указывает на вовлечение этих групп в процессы связывания

древесных частиц при горячем прессовании. СЭМ-изображения и рентгеновские микротомографии композиционных материалов подтверждают, что добавление левана и лигносульфоната позволяет получить более однородную структуру древесного биокompозита.

Библиографический список

1. Котина Е.А., Пестов Н.А., Ревин В.В. Изменение степени кристалличности бактериальной целлюлозы в ходе её механической предобработки при выделении нанокристаллической целлюлозы // Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке : материалы Всероссийской научной конференции с международным участием / Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва. Саранск, 2015. С. 34–36.
2. Лияськина Е.В., Ревин В.В., Грошев М.В., Лияськин Ю.К. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов : учебное пособие. Саранск, 2010. 120 с.
3. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А. Получение бактериальной целлюлозы и нанокомпозиционных материалов : монография. Саранск, 2014. 128 с.
4. Ревин В.В., Пестов Н.А. Способ получения пектина и целлюлозы из свекловичного жома. Патент на изобретение RU 2580884 29.12.2014
5. Briassoulis D. An overview on the mechanical behavior of biodegradable agricultural films // J. Polym. Environ. 2004. N 12. P. 65–81.
6. Kadimaliev D., Kezina E.V., Telyatnik V.A., Revin V.V., Parchaykina O.S., Syusin I.V. Residual Brewer's Yeast Biomass and Bacterial Cellulose as an Alternative to Toxic Phenol-Formaldehyde Binders in Production of Pressed Materials from Waste Wood // BioResources. 2015. №10 (1). P. 1644–1656.
7. Liyaskina E., Revin V., Paramonova E., Nazarkina M., Pestov N., Revina N., Kolesnikova S.. Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing// Journal of Physics: Conference Series. 2017. Vol. 784. N. 1. DOI:10.1088/1742-6596/784/1/012034
8. Revin V., Kadimaliev D, Novokuptsev, N. Preparation of biocomposites using sawdust and lignosulfonate with a culture liquid of levan producer *Azotobacter vinelandii* as a bonding agent // BioResources. 2016. №11(2). P. 3244–3258.

УДК 57.04

Н.С. Рыженков¹, Е.С. Яценко², И.В. Микушина²

¹Алтайский государственный технический университет
им. И.И. Ползунова (Барнаул, Россия)

²Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Оптимизация питательной среды для культивирования бактерий *Bacillus subtilis*

Рассматривается влияние экстрактов растительного сырья при внесении их в питательную среду. В работе были использованы экстракты, приготовленные из 96% и из 40% растворов этанола. Полученная питательная среда оказалась эффективной для стимуляции роста *Bacillus subtilis*.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, растительное сырье, питательная среда.

Введение. В настоящее время биотехнология стала значимым фактором, определяющим развитие таких важных отраслей, как медицина, фармацевтика, пищевая промышленность, сельское хозяйство и др. (Коломиец и др., 2012). Для сельского хозяйства перспективным направлением исследований является производство кормов с использованием новых биологически активных препаратов: ферментных, пробиотических, пребиотических и др. В настоящее время ведутся исследования по разработке и изучению эффективности использования в составе кормов пробиотических препаратов на основе спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* (Сверчкова и др., 2012). Стимуляция роста бактерий возможна путем добавления сырья, богатого флавоноидами, азотсодержащими соединениями. На основании этого были выбраны корневища и корни кровохлебки, лапчатки белой и кофе сорта Арабика.

Материалы и методы исследований. Экспериментальную часть можно разделить на два этапа – приготовление экстракта и оценка влияния на стимуляцию роста. Приготовление экстракта включает

в себя экстрагирование растительного сырья. В данной работе использовали аппарат Сокслета. Он представляет собой круглодонную колбу с экстрактором Сокслета, снабжен обратным холодильником, как показано на рисунке. На 1 г воздушно-сухого вещества использовали 15 мл растворителя. В качестве растворителей выбрали 96 и 40% растворы этанола. При экстрагировании 40% раствором этанола была использована воздушная баня. Продолжительность экстрагирования – 3 часа, количество циклов – 10. На выходе получали спиртовой или водно-спиртовой экстракт растительного сырья (Литвин, 2015).



Схема установки экстрагирования: 1 – обратный холодильник; 2 – экстрактор Сокслета; 3 – патрон; 4 – круглодонная колба; 5 – нагревательный элемент

Исследование влияния экстракта на рост сенной палочки проводили на штамме *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 D. Исследуемый биологический препарат представляет собой сухой порошок из лиофильно высушенных бактерий. Содержание спор бактерий составляет не менее $0,5 \cdot 10^9$ КОЕ/г. Для выращивания, поддержания и хранения культуры использовали агаризованную среду следующего состава (г/л): агар – 18, дрожжевой экстракт – 5, пептон – 15, хлорид натрия – 5, дистиллированная вода – до 1 л (рН = 6,8-7,0). Для культивирования использовали вегетативную среду (г/л): дрожжевой экстракт – 5, пептон – 15, хлорид натрия – 5, дистиллированная вода – до 1 л (рН = 6,8-7,0).

Стерилизацию проводили при давлении 1,1 атм в течение 40 минут (4). Условия культивирования: в колбу Эрленмейера добавляли определенные объемы растительных экстрактов и вегетативную среду (общий объем 50 мл) закрывали ватно-марлевой пробкой и стерилизовали в указанных выше условиях. Культивирование было проведено в шейкер-инкубаторе Innova 44 (New Brunswick, США) при вращении со скоростью 250 оборотов в минуту (эксцентриситет 5 см), температуре 37 °C в течение 24 часов. Далее использовали метод 10-кратных разведений, пересевали на агар и термостатировали при температуре 37 °C в течение 24 часов (5). После инкубирования проводили подсчет колоний с использованием считки колоний scan 100. В качестве контрольной пробы применяли штамм *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 D, выращенный на среде без экстракта.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследований было выявлено, что добавление экстрактов растений в вегетативную питательную среду оказывает как стимулирующее, так и подавляющее действие. Чем выше титр, тем дешевле продукт. Именно поэтому важна стимуляция роста. При добавлении экстрактов лапчатки белой и кровохлебки титр возрос в три раза, в то время как для кофе титр возрос в шесть раз. Для 40% спиртового экстракта лапчатки белой титр возрос в три раза, для кровохлебки – в семь раз. Данные по проделанной работе представлены в таблицах 1 и 2. Все эксперименты проводились в пяти повторностях.

Таблица 1

Результаты влияния 96% спиртовых экстрактов
на стимуляцию роста

Объемная доля экстракта $\phi \cdot 10^3$	Содержание бактерий, КОЕ $\cdot 10^{10}/\text{мл}$					
	Лапчатка белая		Кровохлебка		Кофе Арабика	
2	700	± 90	310	± 90	340	± 40
6	600	± 90	170	± 40	310	± 40
10	590	± 40	360	± 40	270	± 70
15	560	± 60	360	± 30	1150	± 40
20	1020	± 100	1210	± 30	2450	± 100
40	170	± 30	150	± 20	150	± 40

Содержание бактерий в контрольной пробе составило 390 ± 70 КОЕ*10¹⁰/мл. Из таблицы 1 видно, что для 96% спиртового экстракта лапчатки белой при повышении его объемной доли с 2 до 15 единиц стимулирующее действие проявляется, но снижается пропорционально объемной доле. Для 96% спиртового экстракта кровохлебки в интервале от 2 до 15 единиц объемных долей наблюдается подавление роста бактерий, в то время как для кофе Арабика этот интервал – от двух до 10 единиц. 96% спиртовые экстракты кровохлебки и лапчатки белой проявили эффект стимуляции роста в интервале объемных долей от 15 до 20 единиц, а для кофе Арабика эффект наблюдаем при объемных долях в интервале от 10 до 20 единиц. Для всех 96% спиртовых экстрактов растительного сырья объемная доля экстракта, равная 40 единицам, подавляла рост сенной палочки.

Из таблицы 2 видно, что для 40% спиртового экстракта лапчатки белой при его объемных долях от 2 до 10 единиц наблюдается стимулирующее действие на рост бактерий. При объемной доле экстракта 15 единиц действие экстракта стимулирует рост сенной палочки, но он намного меньше, чем для объемной доли 10 единиц. Для объемных долей 20 и 40 единиц обнаружено подавляющее действие экстракта. Для 40% спиртового экстракта кровохлебки его объемные доли в интервале от 2 до 10 единиц подавляют рост. При объемных долях 15 и 20 единиц обнаружена стимулирующая способность, она резко увеличивается пропорционально добавленному экстракту. Объемная доля экстракта 40 единиц подавила рост сенной палочки.

Таблица 2

Результаты влияния 40% спиртовых экстрактов
на стимуляцию роста

Объемная доля экстракта $\phi \cdot 10^3$	Содержание бактерий, КОЕ*10 ¹⁰ /мл					
	Лапчатка белая		Кровохлебка		Кофе Арабика	
2	960	± 90	360	± 20	390	± 30
6	940	± 90	190	± 40	210	± 40
10	1300	± 70	80	± 10	170	± 10
15	490	± 60	970	± 140	60	± 10
20	340	± 30	2600	± 130	40	± 10
40	290	± 30	160	± 30	100	± 40

Таким образом, экстракты были исследованы на предмет стимуляции роста. Выявлено их неоднозначное действие на рост сенной палочки. Для 96% спиртовых экстрактов растений оптимальной объемной долей экстракта является 20 единиц. Для 40% спиртового экстракта лапчатки белой оптимальная объемная доля для стимуляции роста – 10 единиц. Для 40% спиртового экстракта кровохлебки это значение равно 20 единицам.

Выводы. В ходе работы были исследованы экстракты растений на стимуляцию роста бактерий штамма *Bacillus subtilis* ВКМ В-3057 D. Было показано, что для выращивания и хранения сенной палочки достаточно эффективно использовать агаризованную среду. Также обнаружено, что достижение максимального эффекта стимуляции роста возможно при культивировании на вегетативной среде при pH 6,8-7,0, вращении со скоростью 250 оборотов в минуту и температуре 37 °C в течение 24 часов. Отмечено, что внесение экстрактов в целом стимулирует рост бактерий. По результатам работы можно сделать следующие выводы:

Зафиксировано стимулирующее рост действие 96% спиртовых экстрактов растений во всем диапазоне объемных долей за исключением 40 единиц, причем максимальная стимуляция роста достигнута при объемных долях 20 единиц.

При сравнении 96% экстрактов с 40% было отмечено, что 40% спиртовые экстракты стимулируют рост бактерий при более низких объемных долях.

Установлено, что самая благоприятная среда для роста сенной палочки содержит 40% спиртовой экстракт кровохлебки в объемной доле 20 единиц.

Выяснено, что 40% спиртовой экстракт кофе оказывает подавляющее действие на рост бактерий, следовательно, его нельзя использовать для стимуляции роста.

Все исследования проводились на базе инжинирингового центра «Промбиотех», расположенного по адресу: Россия, Алтайский край, Барнаул, ул. Димитрова 66 (Russia, Altai Krai, Barnaul, street Dimitrova 66)

Библиографический список

- Бойко С.С., Яценко Е.С. Влияние ультразвука на *bacillus subtilis* в процессе стационарного культивирования // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности : материалы X Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. Бийск, 2017. С. 321–324.
- Коломиец Э.И., Здор Н.А., Стефанович Л.И. Эффективность выполнения Государственной научно-технической программы «Промышленные биотехнологии» на 2006–2010 годы // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2012. Т. 4. С. 7–13.
- Литвин А.А. Характеризация экстрактивных веществ кровохлебки лекарственной и лапчатки белой. Барнаул, 2015. С. 24.
- Мамедова Л.В., Лебедев Л.Р. Влияние условий культивирования *Bacillus subtilis* на продукцию протеолитических ферментов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2016. №8-1. С. 41–44.
- Сверчкова Н.В., Заславская Н.С., Колосовская М.С., Романовская Т.В., Коломиец Э.И. Пробиотические препараты для кормопроизводства на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2012. Т. 4. С. 107–119.

УДК 579.6

М. Савина, А.Н. Иркутова*Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)***Современные области применения бактериофагов**

Бактериофаги – одни из наиболее распространённых живых объектов на планете. Сейчас активно используются их свойства для решения прикладных задач. С одной стороны, этот просто устроенный объект удобен для изучения функционирования генов и транс-

ляции белка в молекулярной биологии. С другой стороны, обладая наноразмерами, эти частицы нашли свое применение в активно развивающихся нано- и биотехнологиях и нанoeлектронике. На их способности вызывать лизис зараженной культуры основана фаготерапия как метод лечения бактериальных инфекций в медицине и сельском хозяйстве, что особенно важно в эпоху все нарастающей антибиотикорезистентности.

Ключевые слова: бактериофаг, фаговая терапия, геномная инженерия, фаговый дисплей, нанопроводник, катализатор.

Бактериофаги – вирусы бактерий и архей. Они не способны размножаться вне клетки-хозяина по причине недостатка генетической информации для автономного существования. Вне живой клетки большинство бактериофагов циркулирует в виде вирионов, представляющих собой сложные молекулярные кристаллы. По своему строению они различаются большим разнообразием, но в целом устроены достаточно просто. Фаги представляют собой комплекс одного из вида нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК) и белков, особым образом упакованный.

Как и большинство вирусов, бактериофаги являются наноорганизмами, размеры которых не превышают 100 нм. Из-за малого размера и слабого развития микроскопии заметить их в прошлом могли только по косвенным признакам – лизису культуры бактерий, которые он поражает. Это свойство было обнаружено еще в 1896 г., когда британский химик Эрнест Ханкин, изучая антибактериальное действие вод индийских рек Ганга и Джумны, впервые описал фактор, легко проходящий через непроницаемые для бактерий мембранные фильтры и вызывающий лизис микробов.

Настоящим отцом-первооткрывателем, а также первым, кто начал применять бактериофаги в медицине, считают Феликса Д'Эреля, который также наблюдал лизис бактериальной культуры неизвестным агентом. Именно он дал ему такое название, не совсем подходящее для вируса, хотя сам был уверен, что нашел именно его.

Начиная с медицины, бактериофаги плотно обосновались в науке и не только. Они используются в санитарии, электронике, генной

инженерии. Но как основные области их применения можно выделить медицину, ветеринарию и сельское хозяйство, био- и нанотехнологии.

Медицина. В 2013 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) заявила о критической ситуации: резком увеличении скорости распространения инфекций, устойчивых к противомикробным препаратам. По современным данным, более 60% возбудителей априори резистентны к большинству антибиотиков, а через 10–20 лет эта цифра будет близка к 100% (Додова, Горбунова, 2015). В апреле 2014 г. ВОЗ объявляет, что вскоре мы можем вступить в эпоху полной антибиотикорезистентности и тем самым скатиться к временам, когда человечество было бессильно перед натиском бактериальных инфекций. И такое будущее уже не за горами (Harada, Silva и др., 2018). В 2017 г. ВОЗ объявило, что по меньшей мере три человека заражены неизлечимым штаммом гонореи (Alirol1 et al., 2017). Стоит сказать, что первый случай возникновения устойчивости к метициллину был зафиксирован у золотистого стафилококка еще в 1961 г. в Великобритании (Johnson, 2011).

В период с 2013 по 2017 г. количество патентов на новые антибиотики неуклонно возрастало (по данным сайта www.wipo.int). Одновременно с этим за последние 20 лет мы не наблюдали большого количества новых антибиотиков на рынке (Додова, Горбунова, 2015). Это связано с тем, что разработка новых антибактериальных препаратов экономически затратна. Поиск химических соединений занимает немало времени и сил, которые могут не окупиться. Ведь всегда существует большой риск, что бактерии быстро адаптируются к новым агентам, поэтому процесс поиска придется начинать сначала.

Несомненно, антибиотики еще не полностью изжили себя. Достаточно активно изучаются способы преодоления антибиотикорезистентности: ведутся разработки потенциаторов антибиотиков (соединений, которые «прилагаются» к антибиотику и усиливают его действие), используются микроорганизмы нормальной флоры для замещения патогенной, пробуют применять сочетание антибиотиков и ионов серебра для усиления эффективности первых и др. (Owens, 2013, Zabawa et al., 2016). По-видимому, принципиально новым классом природных антибиотиков, которые могут прийти на смену тра-

диционными препаратами, являются так называемые антимикробные пептиды (Гришин, Соколов, 2014; Lazar et al., 2018).

Все эти исследования по большей части находятся на стадии разработок и не внесены в массы. Таким образом, мы сталкиваемся с проблемой создания альтернативной терапии против бактериальных инфекций. Ответом может стать применение бактериофагов, которые, в отличие от вышеописанных способов, применяются в терапии с момента их открытия Феликсом Д'Эреллем в 1917 г. Надо сказать, что именно он первым предложил использовать бактериофаги с лечебной целью (Тикунова, Власов, 2013; Зурабов, Жиленков, 2016; Мохов и др., 2017). В 1919 г. приготовленные им препараты бактериофага были успешно использованы для лечения дизентерии (Тикунова, Власов, 2013).

Создание и использование препаратов бактериофагов в качестве альтернативы антибиотикам предусмотрено также утвержденной В.В. Путиным от 24.04.2012 «Комплексной программой развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года». И это не случайно. Ведь на протяжении XX в. Россия была лидером в области применения бактериофагов в медицине, тогда как в Европе исследования не имели широкого масштаба (Асланов, 2015).

Бактериофаги уже сейчас вносят большой вклад в лечение ряда заболеваний и используются в разных областях медицины. В современной детской гастроэнтерологии применяется широкий арсенал препаратов для коррекции нарушенного микробиоценоза кишечника. Используют такие препараты, как Коли-протейный, Стафилококковый, Синегнойный, поливалентный Дизентерийный, Сальмонеллезный, комплексный Пиобактериофаг (смесь фаголизатов родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxitoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, энтеропатогенная *Escherichia coli*), поливалентный Пиобактериофаг, Интестибактериофаг и др. (Бондаренко, 2013; Додова, Горбунова, 2015). Широко используются фаги в качестве профилактических средств (Щербенков, 2013). Относительно новым направлением использования бактериофагов является их применение в качестве пищевых добавок (Асланов, 2015).

Сообщается об успешном применении в хирургической практике пиобактериофага у пациентов с инфекциями в области хирургического вмешательства. По данным наблюдений, применение фага в 2–2,5 раза сокращает сроки заживления ран. Исследования по фармакокинетики бактериофагов показали, что при пероральном применении они обладают высокой проникающей способностью в ткани (Асланов, 2015).

Бактериофаги можно с успехом применять для борьбы с инфекциями, в патогенезе которых играет роль формирование бактериями биологических пленок, в составе которых микроорганизмы более устойчивы к воздействию защитных сил организма и антибиотикам. В настоящее время растет число публикаций, посвященных роли бактериофагов в разрушении биопленок (Дрюккер, Горшкова, 2012; Асланов, 2015; Мохов и др., 2017).

Применение фагов вместо антибиотиков имеет ряд преимуществ, основанных на природе самих бактериофагов. Фаги высокоспецифичны и направлены против конкретных штаммов патогенных бактерий, не задевая нормальную микрофлору. Они не вызывают аллергии, абсолютно безвредны для человека, не требуют многократного введения, так как способны поддерживать свою численность пока существует их хозяин, обладают полной совместимостью с другими лекарственными препаратами (в том числе их применяют в союзе с антибиотиками), имеют возможность профилактического использования (Щербаков, 2013, Асланов, 2015; Мохов и др., 2017).

Хотя лечение фагами и дает положительный результат, не стоит забывать, что фаги – это биологические регуляторы численности бактериальной популяции, не предназначенные для полного уничтожения своих хозяев. Кроме того, у них есть особые механизмы перехода из литической фазы в лизогенную (Davidson, 2017). Таким образом, фаговая терапия требует глубокого микробиологического изучения.

Ветеринария и сельское хозяйство. Бактериофаги являются универсальным методом борьбы против бактериальных заболеваний. Достаточно подобрать литически активный фаг. В связи с этим фаготерапия актуальна в любой области, где требуется купировать развитие тех бактерий, которых там быть не должно. Фитопатологи и ветеринары активно этим пользуются. С практической точки зре-

ния важно изучение таких фагов, которые способны инфицировать филогенетически различные бактерии (Товкач и др., 2013).

Бактериальный ожог плодовых (*fireblight*) поражает растения семейства *Rosaceae* и является одним из наиболее опасных инфекций плодовых культур (Каримова, Шнейдер и др., 2013). В настоящее время известно 129 видов растений из 37 родов семейства *Rosaceae*, чувствительных к поражению этим бактериозом. Особенно серьезный ущерб болезнь наносит насаждениям айвы, груши, яблони. Для предотвращения развития данного заболевания применяют ряд стандартных процедур, таких как обрезка пораженных органов растений с последующим уничтожением, обработка медьсодержащими препаратами, обработка антибиотиками, использование антагонистических микроорганизмов и т.д. Но каждый из них имеет свои недостатки и ограничения. Достаточно только напомнить о всё нарастающей антибиотикорезистентности. В этой ситуации применение бактериофагов становится новым вариантом борьбы с патогеном (Самойлова, 2016).

Главное преимущество бактериофагов перед другими средствами борьбы с бактериозами состоит в том, что они являются облигатными паразитами бактерий и естественным компонентом экосистем, поэтому их можно использовать для профилактики и сдерживания развития бактериального ожога на всех стадиях развития растения. Установлено, что биологическая эффективность бактериофагов 605фСу1-а в естественных условиях на подвоях айвы составила 89,0%, что доказывает их достаточно высокую эффективность (Самойлова, 2016).

Ведущее место в спектре кишечных токсикоинфекций сельскохозяйственных животных занимают эшерихиозы – инфекционные заболевания, этиологическим агентом которых являются патогенные типы кишечной палочки – бактерии *E. coli*. В наибольшей степени патогенный потенциал возбудителей реализуется у молодняка животных в периоды отъёма. Для лечения применяют такие препараты, как антибиотики, пробиотики, вакцины и бактериофаги. Но у каждого из них имеются свои негативные аспекты (Мелехин и др., 2014).

Спектр негативного влияния применения антибиотиков в сельском хозяйстве настолько широк (аллергенность, токсичность, дис-

биогенность, селекция антибиотикорезистентных штаммов), что правительства ряда стран (в первую очередь ЕС) проводят с 1998 г. политику, направленную на максимальное ограничение, а в перспективе – и на полный запрет применения антибиотиков в сельском хозяйстве. Вакцинирование сопряжено с рядом осложнений на организм, а эффективность оставляет желать лучшего из-за значительного иммунологического полиморфизма патогенных штаммов эшерихий. Пробиотики обладают низкой профилактической эффективностью, хотя и лишены побочных эффектов (Мелехин и др., 2014).

Кроме того, исследованиями многих авторов установлено, что наиболее распространенными возбудителями кишечной инфекции у поросят-сосунов являются энтеробактерии, относящиеся к родам *Escherichia*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*, и др. (Мелехин и др., 2014). Колибактериоз также является серьезной проблемой в птицеводстве, решением которой может стать фаготерапия (Зимин, Кочетков и др., 2016).

В свете вышесказанного применение фагов при лечении выглядит достаточно перспективно, учитывая все преимущества их использования работе (Сколбиков и др., 2012; Афонюшкин и др., 2016).

Биотехнология. Современные исследователи активно используют бактериофаги в инженерной биологии и вот почему. Благодаря своей простоте они становятся удобным объектом для исследований в области молекулярной биологии. Их по праву можно назвать «дрозофилами» молекулярной биологии (Власов, Морозова и др., 2016). Для их изучения с целью открыть природу наследственности в начале XX в. была создана Максом Дельбрюком «фаговая группа» (Воробьев, 2006; Франк-Каменецкий, 2017). С помощью фагов в 1952 г. учеными А. Херши и М. Чейзом было доказана роль ДНК как основной носительницы генетической информации. Исследователи наблюдали за процессом воспроизводства в двух группах бактериофагов: в одной радиоактивными атомами были помечены белки, в другой – ДНК. После инфицирования бактерий такими фагами оказалось, что в зараженную клетку передается только вирусная ДНК, что и послужило доказательством ее роли в хранении и передаче наследственной информации (Белясов, 2012; Власов и др., 2016).

В 1972 г. Р. Берд с коллегами при изучении процесса репликации ДНК кишечной палочки использовали бактериофаги в качестве зондов, способных встраиваться в геном бактериальной клетки, и обнаружили, что процесс репликации идет в двух направлениях вдоль хромосомы (Власов и др., 2016). Большое количество ферментов, повсеместно используемых в молекулярной биологии и генетической инженерии, были открыты в результате исследований бактериофагов. Такими ферментами можно назвать рестриктазы, полимеразы, ДНК- и РНК-лигазы (Власов и др., 2016).

Изучение взаимодействия бактерий и их вирусов привело к открытию прорывной технологии геномного редактирования. Сейчас CRISPR/cas9-технология у всех на слуху (Медведев, 2014; Гоглева, 2016; Власов и др., 2016). Ею активно пользуются в таких областях, как онкология (для лечения раков крови), биотехнология (для создания трансгенных животных и растений), перспективно ее применение в медицине с целью лечения генетических заболеваний человека (Медведев, 2014; Немудрый и др., 2014), и т.д. Но зародилась она в ходе эволюции как своего рода адаптивная иммунная система бактерий. Секвенирование бактериальных геномов позволило обнаружить повторяющиеся нуклеотидные последовательности, обладающие характерной структурой: короткие участки уникальной ДНК – спейсеры – отделены друг от друга короткими палиндромными повторами. Благодаря этой особенности они и получили свое название – CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats), или короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (Медведев, 2014; Гоглева, 2016; Wang et al., 2016). Кроме того, такие CRISPR-кассеты находятся в непосредственной близости от cas-генов, белковые продукты которых обладают хеликазной и нуклеазной активностью (Немудрый и др., 2014; Медведев, 2014; Гоглева, 2016). Данные спейсерные участки гомологичны участкам геномных ДНК бактериофагов, атакующих данные бактерии.

Данная система позволяет редактировать геномы других организмов при определенной модификации системы (Медведев, 2014). Меняя число и тип спейсеров, можно модифицировать сразу несколько разных участков генома.

Конечно, система имеет ряд недостатков, таких как сравнительно высокая вероятность возникновения нецелевых мутаций (Немудрый и др., 2014). Но, тем не менее, на сегодня данная технология является одной из самых популярных. Уже сейчас данная методика выходит из лабораторий и внедряется в медицинскую индустрию (Медведев, 2014).

Про использование бактериофагов в биоинженерии можно говорить много. Например, одним из методов иммунологической технологии является фаговый дисплей (Миненкова, 2007; Harada et al., 2018). Термин «дисплей» происходит от английского display – «отображать». Суть его заключается в создании модифицированного фага, на поверхности которого имеются чужеродные белки. Для этого в фаговый геном внедряется соответствующий ген, который сливается с геном, кодирующим один из поверхностных вирусных белков. Множество бактериофагов, на поверхности которых представлены случайные фрагменты антител, называются фаговой библиотекой. Такие бактериофаги используются при создании моноклональных антител (Тикунова, Морозова, 2009; Боргоякова, Ильичев, 2013; Harada et al., 2018). В фаг встраивают гены антител из β -лимфоцитов, и последующие его поколения несут на своей поверхности соответствующие белки. Затем их несколько раз инкубируют с антигеном, и те вирусы, которые несут нужное антитело, плотно скрепляются с данным антигеном. С помощью этой методики обеспечивается высокая селективность отбора белков с заданными свойствами (Власов и др., 2016).

Кроме всего прочего, разработана технология доставки ДНК-вакцин с использованием бактериофагов (Попов, Микшиш, 2010; Harada et al., 2018). В данном случае вакцинная ДНК встраивается в геном вектора-бактериофага, которым затем иммунизируют макроорганизм. И это далеко не последнее применение загадочных вирусов.

Нанотехнология. Термин «нанотехнология» вошел в обиход в 1974 г. с легкой руки японского физика НориоТанигути, который применил его к субмикронным структурам. Сейчас нанотехнология – это высокоточная технология получения структур с очень маленькими размерами (нанометр, 10^{-9} м) в длину. Продукты данной

науки применяются в качестве игл в сканирующей зондовой микроскопии, носителей катализаторов как платформа для транспорта генов, материалы электродов и т.д. (Балабанов, 2009).

Фаг стоит рассматривать как бионановолокно, которое можно модифицировать с помощью генной инженерии и «украсить» магнитными наночастицами, чтобы затем, создав внешнее магнитное поле, уложить полученные комплексы в горизонтально ориентированный выровненный массив (Власов, Морозова и др., 2016). Так как чужеродные пептиды могут быть «пришиты» к поверхностным белкам бактериофагов, а заряд поверхностных белков очень сильно влияет на самосборку фагов, то можно управлять созданием наноструктур на их основе, контролируя плотность заряда. Чтобы освободить нановолокна от фагов, их прокалывают (кальцинируют) при температуре 550 °C в течение четырех часов на воздухе. За счет этого получают параллельно выровненные и одинаковые по размеру каналы, которые проходят через все волокно (Cao et al., 2013).

В качестве шаблона был выбран бактериофаг M13, и это не случайно. Он является высокопродуктивным вирусом (200 мг/л), содержащим пять белков, которые можно генетически модифицировать: р3, р6, р7, р8 и р9. Белок р8 – основной поверхностный белок, около 2700 копий которого формируют капсид фага M13. Как раз он и был генетически изменен и экспрессирован с помощью фагмидной технологии. К N-концевому домену белка р8 «пришили» субстрат-специфичные пептиды. Данная технология применяется при производстве полупроводниковых нанопроводов и микробатарейных электродов (Nam et al., 2006).

За прошедшие 10 лет возможность получения водорода из этанола для использования в топливных элементах сулит реальное улучшение работы транспортных средств и автономных генераторов энергии. Ученые-материаловеды из Массачусетского технологического института разработали нанокристаллический катализатор на основе того же фага M13, позволяющий осуществлять риформинг этанола с хорошими выходами водорода. Использование вирусов позволяет увеличить активную поверхность катализатора, что в сочетании с распределением пор дает высокую селективность нового катализатора (Neltner, 2010).

Заключение. Бактериофаги по своему строению находятся на самой низкой ступени эволюции жизни на Земле. Именно поэтому вирусы часто называют не «жизнью», а «программой», потенциалом жизни. Но тем не менее их вклад в развитие науки и медицины в частности сложно переоценить. Изучение реализации их генетической информации является одним из фундаментальных исследований, давших начало молекулярной биологии. Способность вызывать лизис клеточной культуры, лежащий в основе фаговой терапии, позволяет фагам выступать в роли альтернативы антибиотикам. Их размеры, описываемые приставкой «нано-», и возможность модификации генома открывают горизонты для их применения в нанобиотехнологиях. Перечисленным их использование не ограничивается. Фаги – своего рода уникальные объекты, которые возможно рассматривать с разных сторон и черпать идеи для их применения практически бесконечно.

Библиографический список

- Асланов Б.И. Бактериофаги – эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам // Медицинский совет. 2015. Вып. 13. С. 106–110.
- Афонюшкин В.Н., Филипенко М.Л., Козлова Ю.Н. Нанобойлоты бактериофаги как альтернатива антибиотикам в ветеринарии // Наука из первых рук. 2016. Т. 70, вып. 4. С. 82–87.
- Балабанов В.И. Нанотехнологии. Наука будущего. М., 2009. 256 с.
- Белясов Н.А. Молекулярная биотехнология. Минск, 2012. 173 с.
- Бондаренко В.М. Новые горизонты бактериофаготерапии // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН [Электронный ресурс]. 2013. №4. С. 1–12. URL: <http://www.elmag.uran.ru> (дата обращения: 29.04.2018).
- Боргоякова М.Б., Ильичев А.А. Картирование эпитопа на белке ERBB-2, узнаваемого моноклональным антителом 4B8, с помощью технологии фагового дисплея // Сибирский онкологический журнал. 2013. Вып. 4. С. 40–44.
- Власов В.В., Морозова В.В., Бабкин И.В., Тикунова Н.В. Бактериофаги: 100 лет на службе человечеству // Наука из первых рук. 2016. Т. 70, вып. 4. С. 40–49.

Воробьев В.С. Макс Дельбрюк – путь от физики к биологии: к 100-летию со дня рождения и 25-летию со дня смерти // Вестник биотехнологии. 2006. Т. 2, вып. 3. С. 68–77.

Гоглева А.А. Исследование CRISPR-систем прокариотического иммунитета методами сравнительной геномики : дис. ... канд. биол. наук. М., 2016. 101 с.

Гришин Д.В., Соколов Н.Н. Дефензины – естественные пептидные антибиотики высших эукариот // Биомедицинская химия. 2014. Т. 60, вып. 4. С. 438–447.

Додова Е.Г., Горбунова Е.А., Аполихина И.А. Постантибиотическая эра: бактериофаги как лечебная стратегия // Медицинский совет. 2015. Вып. 11. С. 49–53.

Дрюккер В.В., Горшкова А.С. Бактериофаги и их функционирование в биопленках // Известия Иркутского государственного университета. 2012. Т. 5, вып. 3. С. 8–16.

Зимин А.А., Кочетков Ф.В., Кононенко С.И., Осепчук Д.В., Скобликов Н.Э. Использование бактериофагов для борьбы с колибактериозом и кампилобактериозом в птицеводстве // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. 2016. №123. С. 1–12. URL: <http://ej.kubagro.ru/2016/09/pdf/29.pdf> (29.04.2018).

Зурабов А.Ю., Жиленков Е.Л., Попова В.М. Снова о фаготерапии: что не так, а что так? // Медицинский совет. 2016. Вып. 16. С. 44–50.

Каримова Е.В., Шнейдер Ю.А. Заец В.Г. Смирнова И.П. Микроорганизмы, вызывающие карантинные для Российской Федерации бактериальные болезни растений // Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство. 2013. Вып. 2. С. 27–37.

Медведев С.П. Как отредактировать наследственность // Наука из первых рук. 2014. Т. 55, вып. 1. С. 10–13.

Мелехин А.С., Пименов Н.В., Золотухин С.Н. Производство и контроль экспериментальной серии поливалентного фагового био-препарата // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2014. Т. 40, вып. 4. С. 82–88.

Миненкова О.О. Фаговый дисплей как универсальный метод исследования белковых взаимодействий : автореф. дис. ...д-ра биол. наук. М., 2007. 230 с.

Мохов Е.М., Кадыков В.А., Морозов А.М. Перспективы применения

бактериофагов в хирургии острого аппендицита // современные проблемы науки и образования [Электронный ресурс]. 2017. №2. С. 129–129. URL: <https://www.science-education.ru/pdf/2017/2/26384.pdf> (дата обращения: 02.06.2018).

Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2014. Т. 6. Вып. 3. С. 20–42.

Попов Ю.А., Микшис Н.И. Генетические (ДНК) вакцины // Проблемы особо опасных инфекций. 2010. Вып. 105. С. 20–24.

Самойлова А. Применение бактериофагов *Egwiniaamylovoga* против бактериального ожога плодовых культур : дис. ... д-ра биол. наук. Кишинев, 2016. 132 с.

Столбиков Н.Э., Кононенко С.И., Зимин А.А. Эффективность различных способов применения нетрансдуцирующих бактериофагов *E. coli* для профилактики пост-отъемной диареи поросят // Научный журнал КубГАУ [Электронный ресурс]. 2012. №78. С. 1–12. URL: <http://ej.kubagro.ru/2012/04/pdf/60.pdf> (29.04.2018).

Тикунова Н. В., Морозова В. В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2009. Т. 1. Вып. 3. С. 22–31.

Тикунова Н.В., Власов В.В. Бактериофаги – враги наших врагов // Наука из первых рук. 2013. Т. 50. Вып. 2. С. 58–69.

Тикунова Н.В., Морозова В.В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // Acta Naturea. 2009. Т. 1. Вып. 3. С. 22–31.

Товкач Ф.И., Файдюк Ю.В., Король Н.А., Кукшина А.И., Мороз С.Н., Мучник Ф.В. Электронная микроскопия и рестрикционный анализ бактериофагов, изолированных из айвы и груши с симптомами бактериального ожога // Мікробіол. журн. 2013. Т. 75. Вып. 5. С. 67–75.

Франк-Каменецкий М. Самая главная молекула. От структуры ДНК к биомедицине XXI века. М., 2017. 313 с.

Щербенков И.М. Бактериофаги. Что мы знаем о них? Современные возможности фаготерапии в практике врача-педиатра // Медицинский совет. 2013. Вып. 2. С. 56–62.

- Alirol E., Wi T.E., Bala M., Bazzo M.L. et al. Multi-drug-resistant gonorrhea: a research and development roadmap to discover new medicines [Electronic recourse]. 2017. Mode of access: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002366> (дата обращения: 29.04.2018).
- Cao B., Zhu Y., Wang L., Mao C. A general approach to controlled alignment of filamentous supra-biomolecular assemblies into centimeter-scale highly-ordered patterns through nature-inspired magnetic guidance // *Angewandte Chemie – International Edition*. 2013. Vol. 52. P. 11750–11754.
- Davidson A.R. Phages make a group decision // *Nature*. 2017. Vol. 541. P. 466–467.
- Harada L.K., Silva E.C., Campos W.F., Del Fiol F.S., Vila M., Dabrowska K., Krylov V.N., Balcao V.M. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. // *Microbiological Research*. 2018. P. 38–52.
- Johnson A.P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011. Vol. 66. P. 43–48.
- Lazar V., Martins A., Spohn R., et al. Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides [Electronic recourse]. 2018. Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29795541> (02.06.2018).
- Nam K.T., Kim D.W., Yoo P.J., Chiang C.Y., Meethong N., Hammond P.T. Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes // *Science*. 2006. Vol. 312. P. 885–888.
- Neltner B., Peddie B., Xu A., Doenlen W., Durand K., Yun D.S., Speakman S., Peterson A., Belcher A. Production of hydrogen using nanocrystalline protein-templated catalysts on M13 phage // *ACS Nano*. 2010. Vol. 6. P. 3227–3235.
- Owens B. Silver makes antibiotics thousands of times more effective [Electronic recourse]. – 2013. Mode of access: <https://www.nature.com/news/silver-makes-antibiotics-thousands-of-times-more-effective-1.13232> (дата обращения: 29.04.2018).
- Wang H., La Russa M., Qi L.S. CRISPR/Cas9 in Genome. Editing and Beyond // *Annu. Rev. Biochem.* 2016. Vol. 163. P. 227–265.
- Zabawa T. P., Pucci M.J., Parr Th. R., Lister T. Treatment of Gram-negative bacterial infections by potentiation of antibiotics [Electronic

recourse]. 2016. Mode of access: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.005> (дата обращения: 29.04.2018).

УДК 577.218

К.В. Сафиуллина¹, Е.А. Кренделева², В.А. Колодязная¹

¹Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет (Санкт-Петербург, Россия)

²ЗАО «БИОКАД», Департамент развития технологий (Санкт-Петербург, Россия)

Создание улучшенных продуцентов рекомбинантных белков с помощью метаболического инжиниринга клеток млекопитающих

На сегодняшний день метаболический инжиниринг является одним из перспективных инструментов генной инженерии для создания клеточных линий продуцентов, позволяющих получить необходимый целевой продукт заданного качества. В данном обзоре рассматривается функционирование индустриально значимых клеточных линий яичника китайского хомячка, анализ некоторых существующих метаболических путей данного продуцента, а также возможность модификации клеточной линии для создания новых метаболических путей с использованием методов рекомбинантной ДНК.

Ключевые слова: моноклональные антитела, клеточные линии, СНО, метаболизм.

Успехи в молекулярной генетике, клеточной биологии и биотехнологии успешно используются для развития новых подходов к лечению на основе моноклональных антител больных онкологическими заболеваниями.

Антитела принадлежат к группе гликопротеинов, называемых иммуноглобулинами (Ig). Свободные молекулы антител секретируются плазматическими клетками, которые образуются в результате пролиферации и терминальной дифференцировки клонов В-лимфоцитов. В-лимфоциты обладают рецепторами, распознающими и связывающими специфические эпитопы. Эти секреторные антитела либо циркулируют в плазме и могут покидать кровеносные сосуды, попадая в ткани, либо присутствуют в секрете некоторых эпителиев (например, молочной и слюнных желез). Другие антитела — не свободные молекулы, а интегральные мембранные белки поверхности В-лимфоцитов (Елизарьев, 2015).

Существует пять основных классов иммуноглобулинов, которые перечисляются в порядке уменьшения их количества в плазме крови или сыворотке: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

Каждый иммуноглобулин состоит из двух одинаковых тяжелых цепей (H) и двух одинаковых легких цепей (L). H-цепи различаются по антигенным свойствам и структуре и определяют класс и подкласс молекулы. Две L-цепи имеют тип каппа (κ) или лямбда (λ). Распределение цепей различается во всех классах и подклассах иммуноглобулинов, а также между различными видами. Ковалентные межцепевые дисульфидные связи соединяют L-цепи с H-цепями и H-цепи с H-цепями. Принимая участие в образовании третичной структуры, они придают молекуле иммуноглобулина большую стабильность (Kumar, 2011).

Моноклональные антитела, в свою очередь, являются *гомогенной популяцией* иммуноглобулинов, специфичных к единственному эпитопу антигена.

Их использование в отличие от традиционных препаратов обусловлено противоопухолевой эффективностью, относительной безопасностью, хорошей переносимостью и небольшим процентом побочных эффектов.

Данный вид терапии чаще используется как дополнение к хирургическому лечению, лучевой терапии и химиотерапии.

Механизмы действия моноклональных антител на клетки-мишени многообразны и не до конца изучены, они включают иммуноопосредованную (антитело- и комплемент-зависимую)

цитотоксичность, стимуляцию фагоцитоза опухолевых клеток, блокаду рецепторов, способность непосредственно включать программу апоптоза, а также тормозить рост опухоли за счет блокады образования в ней новых сосудов (Белозоров, 2007).

Более 90% применяемых в клинике антител производится в клеточных линиях млекопитающих, потому что именно в таких клетках возможно проведение посттрансляционной модификации полноценного антитела.

Белки в клетках эукариот претерпевают следующие посттрансляционные изменения:

1. Реакцию образования дисульфидных связей катализирует фермент дисульфидизомераза. Неправильно уложенный белок оказывается нестабильным и неактивным;
2. Протеолитическое расщепление предшественника, удаление определенного участка полипептидной цепи с образованием функционально активного белка;
3. Гликолизирование — основная модификация, благодаря которой белки приобретают стабильность (а в некоторых случаях особые свойства). Наиболее распространенная реакция гликозилирования – присоединение специфического сахарного остатка либо к серину или треонину (О-гликозилирование), либо к аспарагину (N-гликозилирование)
4. Модификации аминокислот в составе белка: фосфолирование, ацетилирование, ацилирование, гамма-карбоксилирование, сульфатирование, миристилирование и пальмитоилирование.

Есть несколько клеточных линий млекопитающих, которые могут продуцировать антитела нужного качества. Самая используемая – клетки яичника китайского хомячка (Chinese Hamster Ovary, СНО). Данная клеточная линия пригодна как для получения линии, стабильно экспрессирующей нужное антитело, так и для различных скринингов.

Если сравнивать клетки СНО с другими клетками млекопитающих, то они имеют ряд преимуществ:

- 1) высокая скорость пролиферации;
- 2) простота культивирования;
- 3) большой выход биомассы.

Изученность генетического аппарата, что облегчает процесс получения разрешения на производство новых терапевтических белков от FDA (Food and Drug Administration – Управление по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США).

Суспензионное культивирование клеток СНО является современным способом организации процесса, оно позволяет достичь высоких клеточных плотностей и, соответственно, продуктивностей, а также не требует использования продуктов животного происхождения (например, сыворотки).

Но при культивировании в крупномасштабном производстве могут возникнуть серьезные проблемы, влияющие на качество секретируемого белка:

1. Невысокие титры белка – как правило, это экономически невыгодно, так как производственный процесс требует много времени и затрачиваемых на него средств.
2. Очень часто рекомбинантный белок не соответствует требуемому качеству – может содержать низкомолекулярные примеси, фрагменты (недособранные антитела), агрегаты, а чистота целевого белка составляет 45–60%.
3. Процесс очистки рекомбинантного белка довольно трудоемкий, время затратный и дорогостоящий.
4. Белок может быть заряженным, тогда как предпочтение отдается незаряженным молекулам.
5. Существуют требования к биоаналогам, что они должны полностью соответствовать оригинальному препарату по всем параметрам.

Именно из-за таких серьезных недостатков исследователи прибегают к такому инструменту, как метаболический инжиниринг, который позволяет проводить различные манипуляции с геномом клетки и облегчает процесс разработки технологического процесса производства. Основная задача метаболического инжиниринга – создание клеточной линии продуцента, которая секретирует необходимый белок нужного качества.

Метаболическая инженерия определяется как целенаправленная модификация промежуточного метаболизма с использованием методов рекомбинантной ДНК. Генная инженерия с использовани-

ем данной технологии позволяет точно модифицировать специфические реакции в метаболическом пути клетки, выбирая своей целью ферментативные, транспортные и регуляторные процессы, тем самым улучшая свойства клетки для дальнейшего синтеза целевого продукта.

Широко используются два подхода метаболического инжиниринга: повышение эффективности утилизации углерода через первичный метаболизм и снижение накопления лактата в клетке.

Первый подход основывается на изменении метаболического пути, по которому происходит более эффективное использование энергии в клетке. Например, можно скорректировать посредством настройки экспрессии генов или удаления транскрипционных/аллостерических регуляторных механизмов синтез фермента пируват-карбоксилазы, которая способствует образованию оксалоацетата, что, в свою очередь, даёт возможность вовлекать в цикл трикарбоновых кислот больше ацетил-КоА.

Для второго подхода используется нокдаун гена, отвечающего за синтез фермента лактатдегидрогеназы, а также оверэкспрессия ферментов орнитинового цикла – карбамоилфосфатсинтетазы I и орнитинтранскарбамилазы, которые снижают скорость накопления ионов аммония в культуральной среде.

Идентификация новых метаболических путей и механизмов, а также баз данных экспрессии генов и кинетических моделей клеточных метаболических реакций, внесла большой вклад в развитие более точного моделирования метаболических путей.

Таким образом, метаболическая инженерия все еще находится в стадии интенсивного роста и сталкивается с некоторыми проблемами. Одна из основных сложностей заключается в том, что многие гены интереса не могут быть экспрессированы в клетке-реципиенте. Кроме того, промежуточные продукты метаболического пути могут оказывать токсическое воздействие на клетку-хозяина, что в свою очередь потребует дополнительных манипуляций с геномом продуцента.

Несмотря на эти проблемы, метаболический инжиниринг оказался успешным инструментом в области применения рекомбинантной ДНК, и с постоянным совершенствованием методов данная

технология может стать решающей в разработке терапевтических белков.

Авторы работы выражают искреннюю благодарность руководителю отдела клеточных технологий С.В. Косковой, а также научному сотруднику отдела клеточных технологий М.С. Дрожжачих (ЗАО «БИОКАД») за ценные советы и помощь в планировании экспериментов.

Библиографический список

- Белозоров А.П. Лекарственные препараты гуманизированных анти-тел // Провизор. 2007. № 20. С. 15–19.
- Елизарьев П.В. Моноклональные антитела в медицине // Инновационные технологии. 2015. С. 187–193.
- Иммуногистохимические методы: руководство. М., 2011. С. 15.
- Mohan C.M., Kim Y.-G., Koo J., Lee G.M. Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells // J. Biotechnol. 2008. № 3. P. 624–630.

УДК 665.6/7

Е.Ю. Сердюкова, Ю.В. Кожевникова, Е.А. Чернышева

*Российский государственный университет нефти и газа (НИУ)
им. И.М. Губкина (Москва, Россия)*

Биомасса – источник сырья альтернативных видов топлива

Изучена возможность получения альтернативных топлив из растительного сырья. На основе анализа мирового рынка растительного сырья в качестве биомассы было выбрано наиболее подходящее растительное сырье для территории Российской Федерации, такое как отходы деревообрабатывающих и деревоперерабатывающих предприятий (еловые опилки, кленовые листья, сосновые шишки),

торфяные отложения. Растительное сырье подвергалось процессу медленного пиролиза, в результате которого получали биопродукты: пиролизат широкого фракционного состава, газ и углистый остаток.

Ключевые слова: растительное сырье; биомасса; биотопливо; альтернативное топливо; медленный пиролиз растительного сырья.

Введение. Активное производство и вовлечение альтернативных топлив в энергетическую промышленность особенно актуально в связи с нестабильностью нефтяного рынка, сокращением запасов традиционных углеводородов, а также резким колебанием цен на данный ресурс. Кроме того, интерес к новым источникам энергии связан с невозобновляемостью углеводородного сырья и стремлением стран-импортеров нефти уменьшить свою зависимость от стран-производителей. Столь острый вопрос необходимости производства и вовлечения в мировой энергетический баланс альтернативных видов топлива связан с напряженной ситуацией в области загрязнения окружающей среды. Транспорт на сегодняшний день является основным источником вредных выбросов в атмосферу. Исследование агентства по охране окружающей среды США показывает, что при временном «горизонте» 30 лет биодизель из зерна в сравнении с нефтяным топливом даёт сокращение эмиссии газов на 26 % (Зевайкин, 2015). Существует множество растительного сырья, невостребованного в современных условиях, но пригодных для производства жидких видов биологического топлива, в частности, продукты сельского и лесного хозяйства, а также отходы данных отраслей промышленности. Таким образом, уделяя внимание производству топлива из перечисленного сырья, удастся способствовать экономическому развитию сельского хозяйства и лесного комплекса, а также развитию альтернативной энергетики (European Polysaccharide..., 2011). Использование в качестве сырья для производства жидких альтернативных топлив, торфяных отложений представляет собой экономическую «точку роста» для многих регионов Российской Федерации, стран Европейского Союза, а также стран СНГ. Еще одним фактором в пользу развития производства биологического топлива является использование «покинутых» земель.

Стоит принять во внимание тот факт, что развитие биотопливной отрасли конкретной страны напрямую связано с наличием в ней сырьевой базы для производства того или иного вида альтернативного топлива. Преимущество в данной отрасли промышленности получают страны с благоприятным для выращивания сельскохозяйственных культур климатом. Так, например, в качестве сырья в Бразилии используют сахарный тростник, в США – кукурузу, для России потенциальным источником растительного топлива являются отходы деревообработки. Только в Восточной Сибири ежегодно вырубается около 16 млн м³ спелой древесины (преимущественно сосны), которая применяется в лесообрабатывающей, целлюлозно-бумажной и гидролизной промышленности. При существующих способах переработки древесного сырья в целом по России используется лишь около половины биомассы дерева. Остальная часть используемой биомассы – это отходы, представляющие собой древесную зелень (листья, шишки), кору, опилки и стружки. Для стран ЕС сырьевыми фаворитами являются растительные масла, преимущественно рапсовое. В Китае выбор пал на использование незерновых культур и малопродуктивных земель.

Использование растительного сырья влияет на продовольственную безопасность, «часто к заброшенным причисляют земли, которые на деле часто являются основой существования сельского населения» (Развитие альтернативной..., 2015).

Материалы и методы исследований. Исследования по выявлению возможности и эффективности использования растительного сырья с целью получения альтернативных моторных топлив проводились с применением процесса медленного пиролиза на пилотно-лабораторной установке на кафедре технологии переработки нефти Российского государственного университета нефти и газа им. И.М. Губкина.

Процесс пиролиза биомассы представляет собой постепенное нагревание подготовленного сырья до необходимой температуры с определенной скоростью. Первичными продуктами медленного пиролиза биомассы могут быть жидкость, твердое углистое вещество и газы, причем их выходы напрямую зависят от вида и параметров процесса пиролиза. Вторичными продуктами являются: энергия, то-

пливо и химические продукты (Кожевникова и др., 2018). Пиролиз считается медленным, если время, необходимое для нагрева топлива до температуры пиролиза, гораздо больше характерного времени реакции пиролиза. Медленный пиролиз требует низких и средних температур (350–700 °С) при относительно долгом времени пребывания, как правило, от несколько часов до суток. При этом производится три продукта: биоуголь, синтез-газ и жидкость.

Механизм протекания процесса пиролиза растительного сырья заключается в последовательном расщеплении органических соединений согласно представленному порядку: гемицеллюлозы первыми подвергаются термической деструкции в интервале температур 170–260 °С, затем идет распад целлюлозы (240–350 °С) и лигнина (280–500 °С). Гемицеллюлозы дают при разложении меньше смолы и больше газа, чем целлюлоза. При термораспаде лигнина выше выход ароматических соединений, причем лигнин – ключевой компонент, на основе которого образуются высокомолекулярные смолы. Пиролиз целлюлозы, как обычно считают, протекает по параллельным реакциям, одна из которых является процессом дегидратации с образованием угля и малых молекул, а другая – реакцией деполимеризации, приводящей к образованию левоглюкозана и смолы. Левоглюкозан может полимеризоваться, давая уголь и малые молекулы, или подвергаться дальнейшему крекингу с образованием метана, водорода и воды. Образовавшиеся смолы могут быстро испариться, если скорость нагрева высока, или превратиться в уголь при малых скоростях нагрева.

Жидкие продукты пиролиза вызывают большой интерес вследствие их высокой энергетической плотности и потенциальной возможности использования их в качестве жидкого топлива. Жидкость, образующаяся в результате пиролиза, представляет собой густую черную смолянистую жидкость, выход которой может достигать до 80% массы сухого сырья (Капустин, 2011).

Твердый продукт пиролиза представляет собой углистое вещество, выход которого может достигать 30–35% массы сухого сырья.

Газообразные продукты пиролиза – это обычно среднекалорийный газ, выход которого может достигать до 70% массы сухого сырья. Состав газа зависит от сырья и параметров процесса.

В ходе выполнения исследования в качестве растительного сырья, с учетом территориальной особенности Российской Федерации, были выбраны древесные отходы (еловые опилки, стружки), кленовые листья, сосновые шишки, торф. Выбранное сырье обладало определенными физико-химическими параметрами. Влажность представленного сырья поддерживалась на уровне 8–10% масс.

Процесс пиролиза выбранного, заранее подготовленного сырья протекал при температуре 470–550 °С, время реакции варьировалось в пределах 2–2,5 часа, скорость нагрева составляла 3–5 °С/минуту.

В ходе проведения опыта соблюдался следующий порядок выполнения:

- 1) для начала взвешиваем сырье процесса, щелочной абсорбер, масляный абсорбер, приемник с пробкой, пустой реактор;
- 2) загружаем сырье в реактор;
- 3) взвешиваем реактор с приготовленным сырьем, сверху куба кладем асбестовую нить и герметично закрываем, чтобы избежать попадания воздуха в реактор. Помещаем взвешенный приемник в держатель со льдом;
- 4) последовательно соединяем с помощью шлангов: реактор, приемник, щелочной абсорбер, масляный абсорбер, газовые часы;
- 5) помещаем термopару в реактор и включаем в розетку. Реактор накрываем асбестом. Нагреваем согласно температурному режиму;
- 6) процесс ведем до падения последней капли продукта (~ 550 °С);
- 7) после окончания пиролиза выключаем термopару, достаем ее из реактора, разбираем установку, взвешиваем щелочной абсорбер, масляный абсорбер и приемник с пробкой;
- 8) после того, как куб остынет, разбираем его и убираем сверху асбестовую нить, затем взвешиваем куб с твердым остатком;
- 9) зная вес каждого продукта, составляем материальный баланс процесса пиролиза.

Результаты и их обсуждение. В результате пиролиза были получены продукты в трех агрегатных состояниях: твердое углистое вещество, густая черная смолянистая жидкость и среднекалорийный газ. В ходе исследований была установлена взаимосвязь между физико-химическими характеристиками сырья, природой его происхождения с выходами и качеством биопродуктов.

После завершения процесса медленного пиролиза растительного сырья были проведены анализы получившихся продуктов. Для жидкого продукта определен фракционный состав, для газового продукта – состав газа, углистому остатку – насыпную плотность.

Максимальный выход жидкого пиролизата наблюдается при использовании в качестве сырья хвойных опилок (73% масс.), однако высокий выход жидкого продукта также дают кленовые листья (66,1% масс.) и торф (63,5% масс.). Минимальный выход жидкого продукта наблюдается при использовании в качестве сырья сосновых шишек (51,1% масс.).

При пиролизе кленовых листьев наблюдается максимальное газообразование (22,1% масс.), также обильное газообразование происходит при переработке торфяных отложений (11,8% масс.). При пиролизе сосновых шишек и хвойных опилок образуется наименьшее количество газа, причем минимальное газообразование происходит при пиролизе хвойных опилок (1,7% масс.).

Максимальным образованием углистого остатка обладают сосновые шишки (45,3% масс.). При использовании в качестве сырья торфа и хвойных опилок образование углистого остатка наблюдается примерно на одном уровне и составляет 25,2% масс. и 25,3% масс. соответственно. Минимальное образование твердого остатка наблюдается при использовании в качестве сырья процесса кленовых листьев (11,8% масс.).

Исходя из результатов, полученных при пиролизе торфа и еловых опилок, выявлен максимальный выход жидких продуктов. Поэтому именно продукты, полученные при пиролизе данного сырья, были выбраны для дальнейших исследований.

Для жидкого продукта пиролиза 100% торфа был исследован фракционный состав, в результате чего было выявлено, что 48,8% масс. жидкого продукта пиролиза торфа выкипает в диапазоне температур, соответствующих дизельной фракции 180–350 °С. Бензиновая фракция составляет 12% масс н.к. – 180 °С. Фракция больше 350 °С равна 39,2% масс.

Фракционный состав пиролиза древесных отходов представляет собой содержание светлой фракции н.к. – 350 °С 75,34% масс., а фракция больше 350 °С содержится в количестве 24,66 %масс.

Для жидкого продукта пиролиза была установлена возможность использования его в качестве компонента котельного топлива (мазут марки М-100).

Выводы. Жидкие продукты пиролиза вызывают большой интерес вследствие их высокой энергетической ценности и потенциальной возможности использования их в качестве жидкого топлива. Однако необходимо выбирать сырье с учетом экономических и экологических особенностей отдельных стран.

Библиографический список

Зевайкин М.В. Проблематика использования и теоретическое обоснование применения биотоплива в России на современном этапе // Научно-теоретический журнал. 2015. №2. 102 с.

Капустин В.М., Чернышева Е.А., Кожевникова Ю.В., Асаула В.Ю., Критский В.В., Зуйков А.В. Переработка древесной биомассы в компоненты дизельного и котельного топлива // Технологии нефти и газа. 2011. № 6 (77). С. 17–21.

Кожевникова Ю.В., Чернышева Е.А., Сердюкова Е.Ю. Основные аспекты исследований по вовлечению альтернативных ресурсов в производство топливных биокomпонентов // Нефтепереработка и нефтехимия. Научно-технические достижения и передовой опыт. 2018. №3. С. 39–43.

Развитие альтернативной энергетики в мире и в России, Информационно-аналитическая служба / ОАО «Корпорация Развитие». 2015. Спецвыпуск. С. 45–59.

European Polysaccharide Network of Excellence [Электронный ресурс]. URL: http://www.plastice.org/fileadmin/files/EPNOE_Presentation-Bologna_v1.7.pdf

УДК 615.012:615.322:615.28

Р.Г. Тухбатуллина¹, М.П. Шулаева², Д. Кропачева¹

¹Казанский государственный медицинский университет Минздрава России (Казань, Россия)

²Казанская государственная медицинская академия – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Минздрава России (Казань, Россия)

Разработка аппретированных систем из сырья растительного происхождения для лечения дерматологических заболеваний

Остро стоящий вопрос лечения такого заболевания, как розацея, приводит к разработке новых лекарственных композиций, не только химического, но и растительного происхождения. Изучена антимикробная активность аппретированных систем из сырья растительного происхождения в чистом виде и при нанесении их на волокнистый материал – спанлейс для использования их при комплексной терапии розацеа. Экспериментально установлено, что подбор аппретированных систем из растительного сырья оказывал бактерицидное действие на такие условно-патогенные микроорганизмы, как *S. aureus*, *B. cereus*, *C. albicans*.

Ключевые слова: розацеа, аппретированная система, дерматологические заболевания, сырье растительного происхождения, антибактериальная активность.

Введение. Розацеа (розовые угри, акне розовые) – это хроническое заболевание кожи, которое встречается у 8–10% населения во всем мире. В косметическом плане это тяжелое заболевание, поскольку данный дерматоз локализуется главным образом на лице. Различают четыре стадии развития заболевания: эритематозную; эритематозно-папулезную; папуло-пустулезную; узловатую (Старченко, 1998). Поскольку при данном заболевании появляются гнойнички, определенная роль принадлежит инфекционному

фактору – бактериям. Согласно другим теориям большую роль играют наследственный фактор, заболевания системы пищеварения, теория психических нарушений и др. (Djukic, 2012). Поэтому применяются разнообразные методы лечения. Номенклатура лекарственных средств зависит от клинических форм розацеа (Потекаев, 2000).

В настоящее время актуальным является разработка новых лекарственных форм, отличающихся конкурентоспособными свойствами в отношении фармакотерапевтической активности, удобства применения, стоимости и эффективности. На наш взгляд, к таким эффективным лекарственным формам относятся аппреты, сочетающие действие препаратов из растительного и синтетического сырья. Наиболее комфортными в применении являются салфетки, пропитанные антимикробными средствами и фитопрепаратами. Однако на фармацевтическом рынке отсутствуют салфетки, обладающие комбинированным действием на розацеа. Поэтому нами поставлена задача разработки состава аппрета для использования в комплексном лечении данного заболевания.

Материалы и методы исследования. Проведен отбор волокнистого материала для иммобилизации композиционного состава пропитки – это спанлейс производителя ООО «Авангард» (Россия). Спанлейс является нетканым материалом, полученным переплетением волокон и холста водными струями высокого давления. Благодаря данной технологии материал является мягким и более объемным по сравнению с термкрепленными волокнами, а также относится к материалам высокой ценовой категории и характеризуется мягкостью, что особенно важно в нашем случае лечения розацеа, поражающего лицо пациента.

Спанлейс включает по 50% вискозы и полиэфира. Толщина ткани 0,25–0,3 мм, капиллярность 74 мм. Имеет высокие барьерные свойства, сдерживающие проникновение микроорганизмов, что дает возможность применения в медицине и косметологии в качестве материала, снижающего инфицирование человеческих тканей. Спанлейс разрешается использовать для изготовления салфеток, предназначенных детям.

Состав фармацевтической композиции состоял из препаратов противовоспалительного, антимикробного, антибактериального действия, фитопрепаратов и вспомогательных веществ.

Были разработаны две композиции под номером 3 и 4, в состав которых в определенной последовательности были введены следующие препараты: экстракт шишек хмеля, полученный в лаборатории института, хлоргексидин, настойка календулы, эфирное масло розмарина, спиртовой раствор салициловой кислоты.

Мы считаем, что состав пропитки является коммерческой тайной, поэтому количественный и качественный состав каждой композиции не приводится.

Антимикотическую и антибактериальную активности композиций определяли на тест-культурах условно-патогенной микрофлоры. В работе использовали музейные штаммы кафедры микробиологии медицинской академии: *Staphylococcus aureus* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus cereus* (ATCC 10702) и *Candida albicans* (ATCC 885-653).

Первым этапом нашего исследования было определение бактерицидной активности всех композиций без использования салфеток. Суточные культуры микроорганизмов, выращенные на питательном агаре, смывали физиологическим раствором, отстандартизовывали по стандарту мутности 10 ЕД (1 млрд взвесь, или 109 КОЕ/см³-колониеобразующих единиц в 1 см³). Затем взвесь разводили в два раза, получая микробную нагрузку 500 млн клеток в 1 см³. Поверхность питательных сред заражали отстандартизованными культурами в количестве 2 см³ на одну чашку, излишки сливали в дезинфицирующий раствор. В качестве питательных сред использовали среду Сабуро для дрожжеподобных грибов рода *Candida* и мясо-пептонный агар для условно-патогенной микрофлоры. Через 15 минут на инокулированных средах просекали лунки – «колодцы» диаметром 6 мм, в которые вносили исследуемые композиции. Чашки инкубировали при 35 °С в течение 24–48 часов (экспозиция данного времени необходима для диффузии испытуемых веществ в питательный агар, содержащий различные виды микроорганизмов). По истечении времени измеряли зоны задержки роста микроорганизмов с точностью до 0,1 мм (см. табл. 1).

Таблица 1

Антимикотическая и бактерицидная активность фармацевтических композиций

№	Соединение	Зоны задержки роста (мм) через 24 часа				
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Candida albicans</i>
1	3	28	13	11	28	18
2	4	28	12	10	25	12
3	Экстракт шишек хмеля	20	12	9	28	12

Примечание: между степенью чувствительности к антибактериальному компоненту и размером диаметра зоны угнетения роста имеются следующие соотношения: более 10 мм – высокая активность; 10 мм – умеренная активность; менее 10 мм – отсутствие активности.

Второй этап исследования – нанесение композиций на салфетки из спанлейса размером 1 × 1, которые нарезали стерильными ножницами и пропитывали соответствующими композициями, после чего их укладывали на чашки Петри, предварительно зараженные исследуемыми тест-микроорганизмами. Одна салфетка служила контролем – интактная, другой контроль – салфетка заводского производства (см. табл. 2). Для сравнения использовали также экстракт шишек хмеля, который входил в обе композиции.

Результаты и их обсуждение. Как уже мы отмечали, что определенная роль в этиологии заболевания принадлежит инфекционному фактору, поэтому для лечения часто применяют антибиотики (Kanada et al., 2012), метронидазол, суспензии аптечного изготовления, кремы и гели, содержащие метронидазол (Волкова, 2010). Известно, что эти средства дают быстрый эффект, однако отмена их приводит к возвращению симптомов (Курдина, 1998). Также существует теория о связи появления розацеа с воздействием клещей рода Демодекс. Однако получить подтверждение существующих теорий специалистам не удастся. При этом также необходимо учитывать, что многие лекарственные препараты, особенно синтетического происхождения, обладают раздражающим действием на воспаленные участки кожи лица и шеи, осо-

бенно при длительном использовании. Поэтому использование аппретированных систем на основе сырья растительного происхождения, не обладающих раздражающим действием и токсичностью, особенно важно при лечении пациентов молодого возраста. Важным моментом является возможность использования влажных салфеток, находясь в обществе, так как они, в отличие от мазей, не имеют жирного блеска, что положительно сказывается на психологическом состоянии молодых пациентов, особенно женского пола.

Таблица 2

Антимикотическая и бактерицидная активность фармацевтических композиций, нанесенных на салфетки

№	Соединение	Зоны задержки роста (мм) через 24 и 48 часов				
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Candida albicans</i>
1	3	Задержка роста ++++	Задержка роста ++	Задержка роста под салфеткой +	Задержка роста ++++	Задержка роста ++
2	4	Задержка роста +++	Задержка роста ++	Задержка роста под салфеткой +	Задержка роста ++++	Задержка под салфеткой +
3	Экстракт шишек	Задержка роста +++	Задержка только под салфеткой	Задержка роста ++	Задержка роста ++++	Задержка под салфеткой +
4	Интактная салфетка	Задержка роста +	Сплошной рост -	Сплошной рост -	Сплошной рост -	Сплошной рост -
5	Салфетка антибактериальная влажная заводского производства	Сплошной рост -	Сплошной рост -	Сплошной рост -	Сплошной рост -	Сплошной рост -

Примечание:

- + незначительная задержка роста
- ++ выраженная задержка роста
- +++ значительная задержка роста
- ++++ полная задержка роста

Проведенные исследования показали, что созданные композиции были более эффективными в отношении грамположительной микрофлоры: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Candida albicans*.

Оценка результатов проводилась по диаметру зон задержки роста вокруг «колодца», включая и диаметр самого «колодца». Отсутствие зон задержки роста микроорганизмов вокруг «колодца» указывает на то, что испытуемая культура не чувствительна к выбранной композиции. Зоны диаметром более 10 мм указывают на чувствительность испытуемой культуры. Чем больше зона задержки роста испытуемой культуры, тем выше её чувствительность к соединению. Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют о том, что наиболее чувствительны к исследуемым композициям оказались культуры стафилококка, бацилл и грибов. Выраженную антимикробную активность оказывают обе композиции соединений.

Результаты исследования показали, что при нанесении композиций на салфетки более активная задержка роста происходила в отношении грамположительной микрофлоры: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Candida albicans*, тогда как при испытании контрольных салфеток (заводского производства без композиций) они не оказывали бактерицидного действия на выбранную микрофлору.

Считаем, что формирование устойчивости микроорганизмов к традиционным препаратам диктует необходимость поиска новых лекарственных форм с широким аспектом биологической активности в отношении микроорганизмов и грибов. Поэтому является актуальной разработанная нами лекарственная форма – аппретированная система. Созданная композиция активна также и против дрожжеподобных грибов *Candida albicans*.

Выводы. Таким образом, на данном этапе нами проанализированы и обобщены литературные данные о методах терапии розацеа, создана лекарственная форма в виде аппретированной системы, обоснован композиционный состав влажных салфеток и доказана

антибактериальная активность созданных композиций в отношении грамположительной микрофлоры.

Библиографический список

Старченко М.Е., Деменкова Н.В., Данилова Е.Н. О дифференциальной диагностике розовых угрей // Вестник дерматологии и венерологии. 1998. №5. С. 57–58.

Волкова Е.Н., Осипова Н.К., Родина Ю.А. и др. Розацеа: новые подходы к старым проблемам // Российский журнал кожных и венерических болезней. 2010. №2. С. 33–39.

Курдина М.И., Потекаев Н.Н., Потекаев С.Н. и др. Терапия розацеа. Сообщение 3 // Вестник дерматологии и венерологии. 1998. №4. С. 16–20.

Потекаев Н.Н. Розацеа. М.; СПб., 2000. 144 с.

Djukic K. Recidivans Rosacea papulo pustulosa due to recidivans *H.pylori* 9 th EADYSpring Symposium Verona, Italy, 2012. P.183.

Kanada K.N., Nakatsuji T., Galio R.L. Doxycycline indirectly inhibits proteolytic activation of tryptic kallikrein-related peptidases and activation of cathelicidin // J. Invest Dermatol. 132(5). P. 1435–1442.

УДК 637.1

И.А. Функ, Е.Ф Отт

Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий
(Барнаул, Россия)

Пробиотический полутвердый сыр с бифидобактериями

Одной из задач современной пищевой биотехнологии является создание продуктов питания функционального назначения, обеспечивающих поддержание и активизацию жизненно важных функций человека. В Российской Федерации принята программа, направлен-

ная на улучшение здоровья населения за счет продуктов функционального назначения. Функциональные свойства пробиотических продуктов, в том числе сыров, обусловлены наличием биологически активных компонентов (лактобактерии, бифидобактерии, пропионово-кислые бактерии и др.), влияющих на физиологическое состояние систем организма человека. Проведены исследования по подбору штаммов пробиотических микроорганизмов в состав закваски для полутвердого сыра, определена численность полезных микроорганизмов в процессе хранения продукта. По результатам исследований в состав бактериальной закваски включены штаммы *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium adolescentis* и лактококки. Количество лактобацилл в период созревания находилось на уровне $2,8 \times 10^6$ КОЕ/г – $2,4 \times 10^8$ КОЕ/г, бифидобактерий – $8,5 \times 10^5$ КОЕ/г. Содержание пробиотической микрофлоры в сыре в течение 30 суток было в пределах 10^6 – 10^8 КОЕ/г (физиологически значимый уровень). Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на пробиотический полутвердый сыр «Пладоленс» (ТУ 10.51.40 – 084 – 00419710 – 2017).

Ключевые слова: функциональный продукт, полутвердый пробиотический сыр, бактериальная закваска, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium adolescentis*, лактококк.

Введение. Пища является одним из основных факторов окружающей среды, оказывающих влияние на состояние здоровья, работоспособность, умственное и физическое развитие, а также на продолжительность жизни человека. Однако структура питания современного человека характеризуется негативными тенденциями. Это связано с воздействием целого ряда неблагоприятных факторов, влияющих на нормальное функционирование основных систем жизнедеятельности организма. С одной стороны, это ухудшающаяся экологическая обстановка, увеличение количества стрессовых ситуаций, а с другой – массовое бесконтрольное применение различных лекарственных средств, в том числе антибиотиков. В связи с этим возникла серьезная проблема относительно способов конструирования и восстановления оптимальной микрофлоры желудочно-кишечного

тракта человека (Гунина, 2015). В Российской Федерации принята Стратегия повышения качества пищевой продукции до 2030 г. Одной из основных государственных задач является обеспечение населения страны продуктами питания, способствующими активному и здоровому образу жизни за счет употребления в пищу пробиотических продуктов функционального назначения. Функциональные продукты создаются на основе традиционных продуктов питания, но дополняются так называемыми функциональными ингредиентами, способствующими улучшению функций организма. К таким ингредиентам относятся и пробиотики (Распоряжение №1364-р, 2016; Указ Президента РФ №642, 2016).

В соответствии с ГОСТ Р 52349-2005, пробиотик – это функциональный пищевой ингредиент в виде полезных для человека живых микроорганизмов, обеспечивающий при систематическом употреблении его в пищу благоприятное воздействие на организм человека в результате нормализации состава и повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника (ГОСТ Р 52349-2005, 2008). Для создания функциональных продуктов питания используют пробиотические микроорганизмы: бифидобактерии (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*), лактобактерии (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* и *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*) и пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium freudenreichii*). Вышеперечисленные пробиотические микроорганизмы обеспечивают стабилизацию микрофлоры организма человека, восстанавливают ее нарушенный баланс, а также целостность эпителиальных клеточных образований и стимулируют иммунологические функции слизистой оболочки пищеварительного тракта (Каган, 2009; Полянская и др., 2018). Современные стандарты в области функциональных пищевых продуктов регламентируют содержание пробиотических культур в продуктах не ниже 10^6 КОЕ/г (см^3), а в суточной порции – не менее 5×10^7 КОЕ для лактобактерий и 5×10^8 для бифидобактерий (ГОСТ Р 52349, 2008; ГОСТ Р 55577, 2014).

Бифидобактерии составляют основу микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека. Положительное влияние бифидофлоры на физиологические функции организма детей и взрослых связывают с продукцией молочной и уксусной кислот, создающих

в кишечнике кислую реакцию, которая препятствует размножению патогенной, гнилостной и газообразующей микрофлоры (Шендеров, 2001; Curr, 2004; Schnell et al., 2002). Лактобактерии обладают высокой адгезией к слизистым оболочкам, что способствует образованию поверхностной защитной биопленки, благодаря которой они особенно важны при патологии желудочно-кишечного и урогенитального трактов (Pujol et al., 2000). Отличительной особенностью пропионовокислых бактерий является их способность вырабатывать витамин B₁₂, который предотвращает разрушение эритроцитов и жировые перерождения во внутренних органах, а также участвует в регулировании кроветворения и в покрытии нервных волокон миелиновой оболочкой.

В последнее время в Российской Федерации ассортимент функциональных продуктов питания с использованием пробиотических бактерий постоянно расширяется, что обосновано их положительным влиянием на здоровье человека. Пробиотические микроорганизмы используют в производстве кисломолочных напитков (кумыс, айран, наринэ, кефир, биолакт, Бифилин, Лактолин, Бифилакт, бифидокефир, бифидойогурт, бифацил и др.), а также и других видов молочных продуктов. В последнее время пробиотические микроорганизмы нашли свое применение при производстве сыров. Отмечаются такие интересные с точки зрения пробиотикопрофилактики свойства сыров, как высокое содержание белка, защищающее микрофлору от кислой реакции желудка, отсутствие лактозы, длительный (особенно у полутвердых и твердых сыров) срок реализации (Каган, 2009). Поэтому создание пробиотических молочных продуктов, в том числе сыров, является актуальной задачей на сегодняшний момент.

С целью реализации стратегии повышения качества пищевой продукции, а также расширения ассортимента функциональных продуктов в 2017 г. в лаборатории микробиологии Сибирского отдела сыроделия ФГБНУ ФАНЦА проводились работы по созданию пробиотического полутвердого сыра.

Объекты и методы исследования. Объектами исследований служили пробиотические штаммы микроорганизмов (*Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium adolescentis*). Штаммы пробиотических

микроорганизмов были взяты из Сибирской коллекции микроорганизмов (СКМ) лаборатории микробиологии ФГБНУ ФАНЦА отдела Сибирского НИИ сыроделия. Показатели свойств штаммов и готового продукта определяли по стандартным методам: антагонистическая активность диффузионным методом по ТУ 9229-026-04610209-94, количество молочнокислых микроорганизмов по ГОСТ 33951-16, количество бифидобактерий по ГОСТ Р 56139-14, активная кислотность потенциометрическим методом по ГОСТ 32892-14.

Результаты и их обсуждение. При разработке технологии полутвердого сыра с функциональными свойствами в качестве прототипа была применена технология производства сыра «Новосибирский» (ТУ 9225-003-13676118-08). При производстве функционального сыра использовали штаммы пробиотических культур *L. plantarum* и *B. adolescentis* из коллекции СКМ. Пробиотические культуры отбирались по уже известным технологически ценным свойствам (время образования сгустка, антагонистическая активность к *Escherichia coli* и другие свойства). В состав закваски дополнительно вводили молочнокислые лактококки для сыров с низкой температурой второго нагревания (БК Алтай – С, производство ООО «Барнаульская биофабрика»).

В соответствии с ГОСТ 52349 – 2005 содержание пробиотической микрофлоры как функционального пищевого ингредиента в продукте должно составлять не менее 106 КОЕ/г, поэтому важно проследить динамику численности пробиотической микрофлоры в сыре в процессе хранения и готового продукта. Результаты эксперимента представлены на рисунке 1.

Количество лактобацилл в период созревания находилось на уровне $2,8 \times 10^6$ КОЕ/г – $2,4 \times 10^8$ КОЕ/г, количество бифидобактерий – $7,0\text{--}8,5 \times 10^5$ КОЕ/г. Количество бифидобактерий в сыре было немного ниже терапевтического уровня, что можно объяснить относительно невысоким качеством молока-сырья.

Присутствие пробиотических культур повлияло на органолептические показатели готового продукта. Зрелый сыр (30 суток) характеризовался приятным сырным вкусом, эластичной, слегка плотной консистенцией. Рисунок: на разрезе сыра по всей массе рав-

номерный, неправильный, щелевидный, характерный для данного типа сыров. Результаты органолептической оценки представлены на рисунке 2.

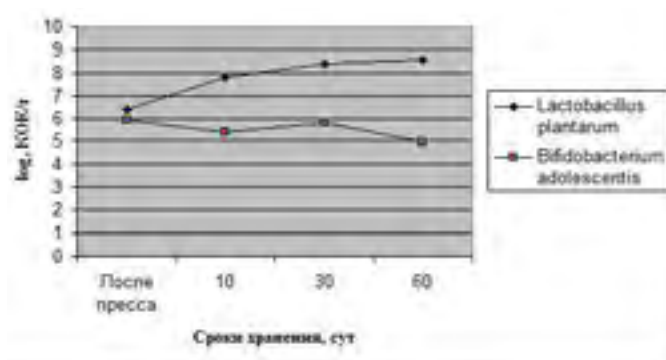


Рис. 1. Динамика численности пробиотического полутвердого сыра в процессе хранения



Рис. 2. Органолептическая оценка пробиотического полутвердого сыра

Сыр получил высокую оценку у экспертной группы Сибирского научно-исследовательского института сыроделия, почти по всем показателям продукт набрал максимальные баллы из возможных. Вкус и запах – 44 балла из 45, консистенция – 25 баллов из 25, рисунок – 10 баллов из 10, цвет теста – 5 баллов из 5, внешний вид – 10 баллов из 10, упаковка и маркировка – 5 баллов из 5. Общая балльная оценка пробиотического сыра составила 99 баллов из 100 возможных (ГОСТ 33630-2016). В процессе хранения продукта интенсивность сырного вкуса усилилась, однако такие пороки вкуса, как горечь, неприятное послевкусие, не были отмечены у опытных варок пробиотического сыра.

Полная характеристика пробиотического полутвердого сыра представлена в таблице.

Характеристика пробиотического полутвердого сыра

Показатель	Норма
1	2
Форма сыра: • прямоугольный брусок с квадратным основанием, со слегка выпуклыми боковыми поверхностями: • размеры, см • масса, кг, пределы	14x14x12 2,5–3,5
Массовая доля жира в сухом веществе, %	50
Массовая доля влаги, %	43
Массовая доля поваренной соли, %	2,0
Активная кислотность, ед рН	5,2
Внешний вид	Корка ровная, тонкая, без повреждений и толстого подкоркового слоя, покрытая парафином. Поверхность чистая
Вкус и запах	Выраженный сырный, слегка кисловатый
Консистенция	Тесто эластичное, слегка плотное, однородное по всей массе

Показатель	Норма
Рисунок	На разрезе сыра по всей массе неравномерный неправильной щелевидной формы
Цвет теста	От белого до светло-желтого
Срок годности при температуре:	
• от -4 до 0 С°, сутки, не более	90
• от 0 до +6 С°, сутки, не более	60

Многочисленные опытные выработки нового сыра (около 600 кг), проведенные в 2017 г., в том числе из биологически обедненного молока (в весеннее и осеннее время) и молока относительно невысокого санитарно-бактериологического качества, показали, что разработанная технология обеспечивает в сырной массе стабильное развитие вкуса и содержание в ней пробиотической микрофлоры.

На новый полутвердый сыр функционального назначения была разработана и утверждена нормативно-техническая документация (НТД) (ТУ 10.51.40 – 084 – 00419710 – 2017). Сыр получил творческое название Пладоленс.

Библиографический список

ГОСТ 33630 – 2015 Сыры и сыры плавленые. Методы контроля органолептических показателей. М., 2016.

ГОСТ 55577-2013 Продукты пищевые специализированные и функциональные. Информация об отличительных признаках и эффективности (с поправкой от 13.07.2017). М., 2014. 23 с.

ГОСТ Р 52349-2005 Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения (с Изменением № 1 от 01.03.2011). М., 2008. 8 с.

Гунина Л. Современные пробиотические функциональные продукты в практике подготовки спортсменов // Наука в олимпийском спорте. 2015. №3. С. 26–33.

Каган Я.Р. Сыры с пробиотической микрофлорой // Сыроделие и маслоделие. 2009. № 2. С. 24–27.

О стратегии научно-технологического развития Российской Федерации : Указ Президента Российской Федерации от 1 декабря 2016 г. №642.

Полянская И.С., Закрепина Е.Н., Семенихина В.Ф. Эффект квази-капсулирования пробиотических культур при производстве кисломолочных продуктов // Молочная промышленность. 2018. № 4. С. 19–21.

Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года. – Утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 29 июня 2016 г. № 1364-р.

Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3: Пробиотики и функциональное питание. М., 2001.

Pujol P., Huguet J., Banquells M. et al. The effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise // Sport. Med. Training Rehab. 2000. Vol. 6. P. 1–15.

Schell M.A., Karmirantzou M., Snel B. et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflect its adaptation to the human gastrointestinal tract // Proc. Natl. Sci. 2002. Vol. 99. № 22. P. 14422–14427.

Use of probiotics in the prevention of atopic dermatitis // Curr. Allergy Asthma Rep. 2004. Vol. 4. № 4. P. 270–275.

УДК 663.88

М.В. Шурова, Г.В. Ларина, В.В. Олифиренко

*Горно-Алтайский НИИСХ – филиал Федерального Алтайского
научного центра агrobiотехнологий (Горно-Алтайск, Россия)*

Функциональные напитки на основе лекарственного растительного сырья и родниковых вод Республики Алтай

Во флористическом кадастре Республики Алтай отмечено более 200 видов ценных лекарственных, технических, кормовых и пищевых растений. Республика обладает значительными запасами дикорастущих полезных лекарственных растений. На ее территории зарегистрировано более 1500 естественных выходов подземных вод.

Родники Горного Алтая отличаются повышенным количеством макро- и микроэлементов и биологически активных компонентов (Каткова, 2013). Все вышеперечисленное указывает на возможность создания пищевой продукции на основе местного растительного сырья с использованием родниковых вод Горного Алтая. Работа проведена в Горно-Алтайском научно-исследовательском институте – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий». Цель исследования – создание на основе концентрированных фитокомпозиций из местного растительного сырья и родниковой воды Горного Алтая функциональных безалкогольных напитков с добавленной пользой с использованием натурального консерванта и натурального сахарозаменителя. Безалкогольные напитки «Целебный дар», «Богатырская сила», «Сибирское здоровье» были приготовлены на основе родниковой воды высшей категории «Алтын Суу», выпускаемой ООО «Алтын Суу». В рецептурном составе безалкогольных напитков использовались концентрированные ягодные соки черники (*Vaccinium ovalifolium* Smith), брусники (*Vaccinium vitis-idaea* L.), клюквы (*Vaccinium oxycoccus* L. (*Oxycoccus palustris* Pers., *O. quadripetalus* Gilib.)) и концентрированные фитокомпозиции, состоящие из растительных экстрактов – смородины черной (лист) (*Ribes nigrum* L.), мяты перечной (лист) (*Mentha piperita* L.), шиповника майского (Ш. коричный) (плоды) (*Rosa majalis* Herrn. (*R. Cinnamomea* L.)), бадана толстолистного (лист) (*Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch), малины обыкновенной (лист) (*Rubus idaeus* L.), копеечника чайного (корень) (*Hedysarum neglectum*), левзеи сафлоровидной (корень) (*Leuzea carthamoides* D.C.) в определенных процентных соотношениях. Функциональная направленность напитков – нормализация желудочно-кишечного тракта и общего состояния организма. Подобрано оптимальное соотношение фитокомпозиции, регулятора кислотности – лимонной кислоты, стевиозида – натурального заменителя сахара, консерванта юглона. Выявлены наиболее гармоничные по органолептическим показателям образцы. Проведена товароведная оценка образцов напитков, которые соответствуют требованиям нормативно-технической документации. Разработана Технологическая инструкция по изготов-

лению безалкогольных газированных напитков на растительном сырье с добавленной пользой. Промышленная апробация разработанных рецептур проведена на производственной базе ООО «Алтын Суу».

Ключевые слова: дикорастущее растительное сырье, родниковые воды, биологически активные вещества, фитокомпозиции, натуральный консервант, функциональные напитки.

Перспективным направлением в создании функциональных напитков остается применение настоев и экстрактов из отечественного растительного сырья, содержащего широкий спектр веществ различной фармакологической направленности. Растительные экстракты в составе напитков повышают тонус организма, адаптивные возможности нервной системы, устойчивость организма к неблагоприятным факторам окружающей среды, обладают антиоксидантными свойствами. При этом наиболее перспективными продуктами являются напитки на основе натуральных соков. Ягодные соки, которые служат основным компонентом безалкогольных напитков, содержат целый комплекс витаминов (Суров, 1981).

Однако рынок в Российской Федерации в отношении безалкогольных напитков с добавленной пользой находится в настоящее время на стадии своего развития. В зарубежных странах уже создан широкий ассортимент таких напитков, которые не только имеют способность утолять жажду, но и обладают дополнительной пользой для здоровья организма в целом. Медициной многих стран безалкогольный напиток с добавленной пользой определен как оптимальная форма пищевого продукта, который используется для обогащения организма человека биологически активными элементами, применяемыми для всех контингентов потребителей. Безалкогольные напитки с добавленной пользой могут стать в перспективе полноценным объектом здорового питания.

Эксплуатация дикорастущих лекарственных растений Республики Алтай дает возможность существенно увеличить список источников естественных ингредиентов и значительно улучшить растительную сырьевую основу пищевых производств, сменить за-

граничное сырье и добавки в продукты питания за счет переработки местных растительных ресурсов.

Производство напитков на растительной основе имеет свои положительные аспекты: комплексное использование сырья местной флоры; внедрение малоотходной технологии при переработке растительного сырья; повышение качества, расширение ассортимента новых видов напитков; создание напитков определенного функционального назначения.

Работа проведена в Горно-Алтайском научно-исследовательском институте – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий».

Цель работы – разработка рецептур функциональных безалкогольных напитков с добавленной пользой на основе родниковой воды высшей категории «Алтын Суу», концентрированных соков – черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.), брусники (*Vaccinium vitis-idaea* L.), клюквы обыкновенной (К. болотная, К. четырехлепестная) *Vaccinium oxycoccus* L. (*Oxycoccus palustris* Pers.. *O. Quadripetalus* Gilib.) с введением концентрированных экстрактов фитокомпозиций плодов – шиповника коричневого (*Rosa majalis* Herrn. (*R. cinnamomea* L.)), рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.); листьев – малины обыкновенной (*Rubus idaeus* L.), смородины черной (*Ribes nigrum* L.), мяты перечной (*Mentha piperita* L.), бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch); корней – копеечника чайного (*Hedysarum neglectum*) и левзеи сафлоровидной (*Leuzea carthamoides* D.C.).

Безалкогольные напитки на фитооснове были приготовлены на основе родниковой воды «Алтын Суу», выпускаемой ООО «Алтын Суу». Сырьем для производства очищенной питьевой воды «Алтын Суу» является природная родниковая вода источника Таш-Озы.

По общей минерализации вода родника относится к пресным (0,39 г/л); по гидрохимическому составу – гидрокарбонатные кальциевые, средние жесткие (4,1 мг-экв/л), нейтральные (pH-7,5). В водах родника присутствуют такие биогенные микроэлементы, как железо и цинк в количествах 0,037; 0,04 мг/л соответственно. Кроме того, в составе родника обнаружены кремниевая кислота, серебро и селен в количествах 27,91; 0,006; 0,0024 мг/л соответственно. По нормативам качества (СанПин 2.1.4.1116-02) воды родника могут быть отне-

сены к высшей категории (Шурова, 2015).

В рецептурном составе безалкогольного напитка «Целебный дар» на основе сока плодов черники использовались концентрированные фитокомпозиции, состоящие из растительных экстрактов – шиповника коричневого (плоды), малины обыкновенной (лист), мяты перечной (лист), бадана толстолистного (лист), рябины обыкновенной (плоды), левзеи сафлоровидной (корень).

В рецептурном составе безалкогольного напитка «Богатырская сила» на основе сока плодов брусники использовались концентрированные фитокомпозиции, состоящие из растительных экстрактов – малины обыкновенной (лист), мяты перечной (лист), смородины черной (лист), бадана толстолистного (лист), рябины обыкновенной (плоды), копеечника чайного (корень), левзеи сафлоровидной (корень).

В рецептурном составе безалкогольного напитка «Сибирское здоровье» на основе сока плодов клюквы использовались концентрированные фитокомпозиции, состоящие из растительных экстрактов – шиповника коричневого (плоды), малины обыкновенной (лист), мяты перечной (лист), бадана толстолистного (лист), рябины обыкновенной (плоды), копеечника чайного (корень), левзеи сафлоровидной (корень) в определенных процентных соотношениях (табл. 1).

Применение в составе напитков листьев смородины черной, мяты перечной, бадана толстолистного, малины обыкновенной, плодов шиповника коричневого и рябины обыкновенной, корня левзеи сафлоровидной обусловлено фармакологическими свойствами указанных растений в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIII.

Полезные и лечебные свойства копеечника чайного или красного корня общеизвестны. Красный корень обладает противовоспалительным, болеутоляющим, антиоксидантным, кровоостанавливающим, мочегонным, тонизирующим действием. Содержащиеся в растении катехины окрашивают настой корня в красный цвет, поэтому копеечник называют красным корнем. Как отхаркивающее средство его используют при заболеваниях органов дыхания. Отвар корней копеечника применяют при малокровии, женских заболеваниях, заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Как чай его пьют для повышения физической выносливости и улучшения иммуните-

та, нормализации сна. Красный корень увеличивает количество гемоглобина в крови, может использоваться для профилактики и комплексного лечения анемии. Красный корень будет эффективным и при заболеваниях центральной нервной системы, печени, мочевого пузыря, при лечении водянки.

Таблица 1

Рецептурный состав фитокомпозиций, %

Растительный компонент Концентрированный экстракт	Фитокомпозиция		
	Целебный дар	Богатырская сила	Сибирское здоровье
Шиповник, плоды	8	-	8
Малина, лист	12	4	5
Мята, лист	8	4	4
Смородина черная, лист	-	2	11
Бадан, лист	2	2	2
Рябина обыкновенная, плоды	6	8	11
Копеечник чайный (красный корень), корень	-	12	-
Левзея сафлоровидная (маралий корень), корень	4	8	4
Черника, плоды	60	-	-
Брусника, плоды	-	60	-
Клюква, плоды	-	-	55
Итого	100	100	100

В рецептуре напитков все компоненты сбалансированы по фармакологическому действию, исходя из данных таблицы 2 можно определить их функциональную направленность – нормализация желудочно-кишечного тракта и общего состояния организма.

Для изготовления безалкогольных напитков использовали готовые концентрированные фитокомпозиции рецептурный состав которых приведен в таблице 1.

Таблица 2

Функциональная направленность напитков
«Целебный дар», «Богатырская сила» и «Сибирское здоровье»

Фармакологическая активность	шиповник	малина	мята	смородина черная	бадан	рябина обыкновенная	копеечник чайный	леuzea сафлоровидная	черника	брусника	клюква	Итого
Целебный дар												
Спазмолитическое			+									1
Желчегонное	+								+			2
Слабительное	+					+						2
Противо- воспалительное	+	+	+		+	+			+			6
Мочегонное	+								+			2
Потогонное		+				+						2
Общеукрепляющее	+				+			+				3
Анестезирующее			+									1
Богатырская сила												
Спазмолитическое			+									1
Желчегонное				+						+		2
Слабительное						+						1
Противо- воспалительное		+	+		+	+	+			+		6
Мочегонное				+						+		2
Потогонное		+		+		+						3
Общеукрепляющее					+	+		+				3
Анестезирующее			+				+					2

Фармакологическая активность	шиповник	малина	мята	смородина черная	бадан	рябина обыкновенная	копеечник чайный	левея сафлоровидная	черника	брусника	клюква	Итого
Сибирское здоровье												
Спазмолитическое			+								+	2
Желчегонное	+			+								2
Слабительное	+					+						2
Противо- воспалительное	+	+	+		+	+						5
Мочегонное	+			+							+	3
Потогонное		+		+		+						3
Общеукрепляющее					+	+		+				3
Анестезирующее			+									1

Подобрано оптимальное соотношение фитокомпозиции, регулятора кислотности – лимонной кислоты, стевиозида – натурального заменителя сахара, консерванта юглона.

Стевиозид – гликозид растительного происхождения, применяемый как подсластитель, содержит нулевое количество калорий и углеводов, рекомендован для употребления людям с сахарным диабетом или соблюдающим диету.

Юглон – природное соединение из группы нафтохинонов, содержится в листьях, коре, коже, цветках и цветочных почках грецкого ореха. По химической структуре юглон представляет 5-окси-1,4-нафтохинон, обладает антимикробным действием. Юглон относится к пищевым добавкам, не оказывающим вредного воздействия на здоровье человека (Приложение 7 к СанПин 2.3.2.1078-01 от 14.11.2001). В пищевой промышленности применяется как пищевой консервант, в концентрации 0,8–1,0 мг/кг оказывает выраженный консерви-

рующий эффект в безалкогольных напитках, а также в некоторых продуктах переработки плодов и ягод, позволяя увеличить сроки хранения напитков и плодово-ягодных консервов даже при низком содержании сахара. Юглон применяется в очень малых концентрациях, не влияет на вкус и запах консервированных продуктов, может быть использован с любыми вкусовыми добавками, заменяющими сахар. В Федеральном государственном унитарном предприятии Государственный научный центр «НИОПИК» (ФГУП ГНЦ «НИОПИК») разработана и освоена в опытно-промышленном масштабе оригинальная экологически чистая технология получения препарата Юглон, который выпускается по ТУ 9154-014-05784466-2004 и содержит не менее 95% основного вещества.

Таблица 3

Рецептурный состав безалкогольных функциональных напитков «Целебный дар», «Богатырская сила» и «Сибирское здоровье», г

Наименование сырья	Целебный дар	Богатырская сила	Сибирское здоровье
Вода «Алтын Суу»	984,6	984,6	984,6
Фито-композиция «Целебный дар»	10	-	-
Фито-композиция «Богатырская сила»	-	10	-
Фито-композиция «Сибирское здоровье»	-	-	10
Подсластитель – экстракт стевии	3,0	3,0	3,0
Регулятор кислотности – лимонная кислота	2	2	2
Углекислый газ	0,4	0,4	0,4
Природный консервант юглон	0,001	0,001	0,001
Итого	1000	1000	1000

Модельные образцы напитков были подготовлены в соответствии с технологической инструкцией по производству безалкогольных напитков. Выявлены наиболее гармоничные по органолептическим показателям образцы. Данные образцы имеют ярко выраженные и запоминающие аромат и запах. Базовая рецептура

безалкогольных напитков «Целебный дар», «Богатырская сила», «Сибирское здоровье» представлена в таблице 3.

Проведена товароведная оценка образцов напитков, которые соответствуют требованиям нормативно-технической документации (ГОСТ Р 56543-2015).

Таким образом, разработаны рецептуры функциональных безалкогольных напитков с добавленной пользой на основе местного растительного сырья и родниковых вод, благоприятно влияющих на работу желудочно-кишечного тракта и общего состояния организма. Разработана Технологическая инструкция отделения по изготовлению безалкогольных газированных напитков на растительном сырье (фитонапитки) с добавленной пользой. Промышленная апробация разработанных рецептур проведена на производственной базе ООО «Алтын Суу».

Библиографический список

ГОСТ Р 56543-2015 Напитки функциональные. Общие технические условия.

Каткова Е.Г., Оборин М.С., Климова О.В. Рекреационный потенциал родников на территории Горного Алтая // Вестник Северного (Арктического) федерального университета. Серия: Естественные науки. 2013. Вып. №1. С. 5–8.

Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск, 1991. 431 с.

Положий А.В., Гольдберг Е.Д., Гуреева И.И. и др. Лекарственные растения Сибири. Томск, 1995. 325 с.

Сборник основных правил, технологических инструкций и нормативных материалов по производству безалкогольной продукции / под ред. Н.Г. Саришвили. М., 2000. 280 с.

Суров Ю.П., Сахарова Н.А., Сутормина Н.В. Ресурсы лекарственного и плодово-ягодного сырья в Горном Алтае. Томск, 1981. 241 с.

Шурова М.В., Ларина Г.В. Природная вода с родника Таш-Озы // Материалы V Междунар. научно-практ. конференции, посвященной 85-летию ГАНИИСХ. Горно-Алтайск, 2015. С. 407–409.

УДК 573.6.086.83:577.114.4/.8

В.В. Шутова, Е.А. Парашкина

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва (Саранск, Россия)

Использование микробных альгинатов для получения экологически безопасных биокомпозиционных материалов *

Изучена возможность использования микробных альгинатов для создания экологически безопасных биокомпозиционных материалов на мелассной среде получили культуральную жидкость *Azotobacter vinelandii* Д-05 с содержанием полисахарида 6,5 г/л и вязкостью 0,5 дПа·сек. При помощи ИК-спектроскопии показали, что при культивировании *A. vinelandii* образуется полисахарид альгинат. Об этом свидетельствует наличие полос поглощения в областях 808, 1320 см⁻¹ и 787, 1290 см⁻¹, характерных для маннурановой и гулурановой кислот, которые являются структурными единицами альгината. Озонирование культуральной жидкости привело к появлению карбоксильных групп, что доказывается наличием полос поглощения в области 1180 см⁻¹. Показана возможность использования культуральной жидкости в качестве биологического связующего для получения биокомпозиционных материалов. Величина предела прочности древесно-стружечной плиты при температуре прессования 160 °С составила 11,2 МПа. Добавление к пресс-массе озонированной альгинатсодержащей культуральной жидкости позволило получить биокомпозиты с улучшенными физико-механическими свойствами. Совместное использование лигносульфоната и культуральной жидкости, содержащей альгинат, повышает влагостойкость биокомпозиционных материалов. Прочность лучших образцов полученных материалов составляла 20 МПа, плотность 1296 кг/м³. Добавление натриевого жидкого стекла снизило влагопоглощение древесностружечных плит.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-05054\18.

Ключевые слова: экзополисахарид, меласса, биокомпозиционные материалы, древесностружечные плиты, альгинат, *Azotobacter vinelandii*.

Введение. Полисахариды – это природные биополимеры, которые обладают уникальными свойствами и имеют широкий спектр применений (Ревин и др., 2015). В настоящее время особенный интерес представляет использование микробных полисахаридов в качестве биологического связующего с целью получения древесных биокомпозиционных материалов (Ивинкина и др., 2012; Шутова, Ревин, 2014; Ревин и др., 2016).

Альгинат является гетерополисахаридом, состоящим из альгиновых кислот. Распределение остатков мономеров этих кислот вдоль полимерной цепи носит блочный характер и образует три типа блоков:

- 1) гомополимерные блоки из монотонных последовательностей остатков (β -D-маннуроновой кислоты (М-блоки);
- 2) гомополимерные блоки из монотонных последовательностей остатков α -L-гулууроновой кислоты (Г-блоки);
- 3) гетерополимерные блоки с регулярным чередованием остатков обеих кислот (М-Г-блоки) (Hay et al., 2014).

Такое своеобразное строение является результатом ступенчатого биосинтеза молекул полисахарида, при котором вначале образуются линейные полиманнуронаны, а затем в этих полимерных предшественниках происходит эпимеризация при атоме С(5) части остатков β -D-маннуроновой кислоты под действием специфического фермента – полиманнуронан-С(5)-эпимеразы, что приводит к появлению в составе полимера остатков α -L-гулууроновой кислоты (Chèze-Lange et al., 2002).

Бактериальный альгинат обычно отличается от полимеров водорослей более высокой относительной молекулярной массой (у *Azotobacter vinelandii* – от 340 000 до 4 000 000), наличием О-ацетильных групп, причем ацетильные группы занимают положения 2 или 3 (иногда сразу оба) в остатках D-маннуроновой кислоты и отсутствием ГГ-звеньев (Gimmestad et al., 2006; Draget, Taylor, 2011).

Цель работы – культивирование *Azotobacter vinelandii* Д-05 на меласной среде для синтеза альгината и исследование возмож-

ности использования культуральной жидкости, содержащей альгинат, и лигносульфоната в качестве биосвязующего при изготовлении прессованных биокомпозиционных материалов из отходов.

Выбор культуральной среды из мелассы и добавление лигносульфоната не случаен, так как в России, помимо ужесточения экологических требований к эмиссии фенола из древесностружечных плит, существует проблема утилизации отходов производств, поэтому своей задачей ставили не только получить безопасное связующее вещество для изготовления древесных композиционных материалов, но и совместить этот процесс с переработкой отходов, в результате чего формируется цикл безотходной работы пищевых и целлюлозно-бумажных предприятий.

Материалы и методы исследований. Объектами исследования являлись культуральная жидкость *A. vinelandii* штамм Д-05 и биокомпозиционные материалы, полученные с использованием культуральной жидкости и лигносульфоната.

Для поддержания культуры и выращивания бактерий *A. vinelandii* готовили агаризованную среду следующего состава, г/л: KH_2PO_4 – 0,2; K_2HPO_4 – 0,8; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{CaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; FeCl_2 – 0,05; Na_2MnO_4 – 0,05; дрожжевой экстракт – 0,5; сахароза – 20,0; агар – агар – 20,0. pH 7,0 – 7,2. Автоклавировали при 121 °C 20 мин. Бактерии выращивали при 28 °C в течение 72 ч.

Исходным посевным материалом является культура на скошенной агаризованной среде, с которой делали смыв 10 мл предварительно приготовленной питательной среды, этим смывом засеивали колбы со средой с сахарозой без агара. Полученную культуру выращивали в шейкерах Environmental shaker – Inkubator ES – 20/60 при 28 °C и 250 об./мин 1–2 суток.

Для получения культуральной жидкости, содержащей полисахарид, штамм культивировали на питательной среде с мелассой. Бактерии *A. vinelandii* в экспериментальных средах выращивали трое суток при тех же условиях, что и инокулят. Засев проводили из расчета 5% инокулята к объему среды. Также проводили засев в биореакторы. В предварительно стерилизованный биореактор заливали 800 мл питательной среды на основе мелассы и 100 мл инокулята, выращенного в шейкерах-инкубаторах, и производили культивирование в те-

чение трех суток при скорости перемешивания 250 об./мин, аэрации 0,5 л/мин. В культуральной жидкости на третьи сутки определяли рН, содержание альгината – осаждением изопропиловым спиртом и высушиванием осадка, биомассу – высушиванием, вязкость – с использованием вискозиметра ротационного цифрового ВРЦ для определения условной динамической вязкости.

Для проведения озонирования культуральной жидкости был использован генератор озона «Алтай» (Волгоград).

Для изготовления биопластиков использовали фракцию сосновых опилок размером около $0,8-1 \times 3-4 \times 10-20$ мм и биосвязующее, полученное при культивировании *A. vinelandii* на мелассе. Для получения пресс-массы на основе полисахарида альгината 80 г опилок (влажностью 4–5%) смешивали с культуральной жидкостью. Высушивание пресс-масс проводилось в сушильном шкафу при температуре 70 °С.

Обработанные опилки загружали в пресс-форму и подвергали прессованию на вулканизационном гидравлическом прессе GT – 7014 – F50. Образцы кондиционировали в течение суток для набора прочности, взвешивали и определяли физико-механические свойства по стандартным методикам. Для получения контрольных образцов биоматериалов 80 г древесных опилок подвергали горячему плоскому прессованию при тех же условиях, что и опытные.

Также были получены биокомпозиционные материалы (биопластики) с использованием в качестве связующего технического лигно-сульфоната в порошковом виде. Пресс-масса состояла из древесных опилок, лигносульфоната и биосвязующего, содержащего альгинат. Для повышения гидрофобных свойств данного биоматериала в качестве добавки было использовано натриевое жидкое стекло.

ИК-спектры регистрировались на приборе ИК-Фурье Спектрометр IR Prestige – 21 («Shimadzu Corporation», Япония) и обрабатывались с помощью программы OriginPro8.

Статистическую обработку результатов исследования проводили на персональном компьютере с использованием программы MS Excel. Рассчитывали среднее арифметическое и ошибку среднего при доверительной вероятности 95%.

Результаты и их обсуждение. Для получения экологически чистых древесных плит использовали *Az. vinelandii* Д-05. Инокулят го-

товили на среде с сахарозой, дрожжевым экстрактом и смесью микроэлементов. При микропировании клетки азотобактера были овальной формы, располагались одиночно или парами (рис. 1).

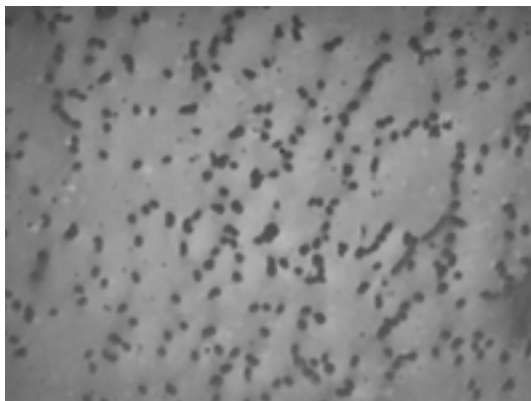


Рис. 1. Микроскопический препарат *Azotobacter vinelandii* Д-05 (окраска метиленовым синим)

Показано, что данный штамм азотобактера способен расти и синтезировать альгинат на сахарозных средах (Revin et al., 2018). Для получения культуральной жидкости с альгинатом бактерию культивировали на мелассной среде. Меласса (патока), являющаяся отходом сахарного производства, представляет собой густую, вязкую жидкость темно-коричневого цвета со специфическим запахом карамели и меланоидинов, которая содержит в своем составе 25–50% сахарозы, минеральные вещества и микроэлементы. Ее можно использовать для получения различных бактериальных полисахаридов (Revin, Shutova, 2015; Revin et al., 2016).

Инокулятом засевали биореактор объемом 1 л (800 мл питательной среды на основе мелассы и 100 мл инокулята, выращенного в шейкерах-инкубаторах) и проводили культивирование в течение трех суток.

При исследовании было установлено, что pH среды понизился и достиг значения 6,4. Это связано с накоплением в среде продуктов жизнедеятельности микроорганизма – образованием органических кислот как продуктов неполного окисления углеводов и образовани-

ем самого полисахарида. Условная динамическая вязкость по окончанию роста составила 0,5 дПа · сек.

Адгезивные свойства биологического связующего должны зависеть от содержания в его составе бактериального экзополисахарида (Ревин и др., 2010). Средний выход альгината на третьи сутки был 6,5 г/л. Увеличение количества полисахарида можно достичь путем оптимизации состава питательной среды и условий культивирования продуцента. В культуральной жидкости биомасса составляла 2,15 г/л. Таким образом, для культивирования азотобактера и получения альгината можно использовать среды на основе свекловичной мелассы.

Известно, что культуральные жидкости бактерий-продуцентов полисахаридов можно использовать для получения древесностружечных плит (Revin, Shutova, 2015; Revin et al., 2016). На следующем этапе работы изготавливали прессованные материалы из сосновых опилок с альгинатсодержащим связующим на основе культуральной жидкости *A. vinelandii*. Пресс-масса состояла из 80 г опилок и 120 мл биологического связующего, ее высушивали и проводили горячее прессование при давлении 20 т (26,1 МПа), 20 мин при 160 °С. Образцы кондиционировали в течение суток. Результаты исследований плотности и предела прочности при статическом изгибе представлены в таблице 1. Контролем служили образцы плиток из опилок без добавления биосвязующего.

Таблица 1

Плотность и предел прочности биокомпозигов
(температура прессования 160 °С)

Плотность, кг/м ³		Предел прочности, МПа	
Без связующего	С культуральной жидкостью	Без связующего	С культуральной жидкостью
1097,5±16,2	1164,5±8,4	3,2±0,4	11,2±0,6

Значение предела прочности при статическом изгибе контроля – 3,2 МПа. Толщина полученных плит – от 8 до 9,5 мм. При добавлении биологического связующего данные характеристики значительно улучшились и составили 11,2 МПа, плотность – 1164,5 кг/м³. Это значение соответствует требованиям ГОСТ 10632-2014. Для плит типа Р2 (плиты для использования внутри помещений, включая

производство мебели, для использования в сухих условиях) толщиной от 6 до 13 мм предел прочности должен быть не менее 11,0 МПа.

Древесина – материал, изменяющий свои размеры в зависимости от влажности. Так, при контакте с водой или влажным воздухом происходит разбухание – изменение толщины. Сродство древесины к воде обусловлено взаимодействием полярных групп древесного комплекса с полярными гидроксильными группами воды. Образцы имели высокое водопоглощение и разбухание по толщине. Это значит, что их можно использовать как теплоизоляционный материал, в качестве перегородок и перекрытий в помещениях с небольшой влажностью.

Далее было проведено озонирование культуральной жидкости *A. vinelandii* с полисахаридом альгинатом. Для этого был использован генератор озона «Алтай». Время обработки 45 мин.

Чтобы оценить химические и структурные изменения, происходящие при озонировании, использовали метод ИК Фурье спектроскопии (см. рис. 2). В ИК-спектрах альгината имеются полосы поглощения, свойственные всем полисахаридам – 3000–3500 см^{-1} (колебания ОН-групп), 2900–2950 см^{-1} (колебания CH_2 -групп), 1010–1050 см^{-1} (колебания С-О-С групп сахаров). Характерными для ИК-спектра альгината являются полосы поглощения в области 1616 см^{-1} ...1419 см^{-1} , обусловленные присутствием карбоксилат-ионов, а также 808 см^{-1} и 1320 см^{-1} (колебания маннуроновой кислоты (М-блоки)), 787 см^{-1} и 1290 см^{-1} (колебания гулууроновой кислоты (G-блоки) (Chandia et al., 2001; Leal et al., 2008; Larkin, 2011; Tian et al., 2013; Subramanian et al., 2015; Liu et al., 2016). При озонировании произошло накопление карбоксильных групп, что можно увидеть по полосе 1180 см^{-1} .

Физико-механические характеристики биокомпозита на основе биологического связующего после озонирования культуральной жидкости стали лучше. Значение предела прочности при статическом изгибе – 13 МПа при толщине плит 8,5–9 мм. Скорее всего, это связано с тем, что образовались реакционноспособные группы на концах фрагментов полимерных молекул полисахаридов. Также озон окисляет гидратированные молекулы полисахаридов и приводит к накоплению альдегидных и карбоксильных групп.

Далее нами были получены биокомпозиционные материалы при тех же условиях. В пресс-массу кроме опилок и культуральной жидкости для улучшения физико-механических свойств биопластиков вносили 5 % лигносульфоната. ЛГС по строению представляет собой фенилпропановый полимер, мономерное звено которого, кроме присущих ему функциональных групп, имеет сульфогруппу $-SO_3H$, обеспечивающую гидрофильность исходно водонерастворимой макромолекулы. ЛГС образуют в воде коллоидные растворы и склонны к термополимеризации. Данные таблицы 2 показывают, что добавление лигносульфоната в культуральную жидкость значительно улучшает прочностные показания. Плотность увеличивалась до $1296,6 \text{ кг/м}^3$, а прочность при статическом изгибе – от 11,2 до 17 МПа при толщине плит 9–10 мм. Также можно сделать вывод о том, что добавление лигносульфоната улучшает влагостойкость.

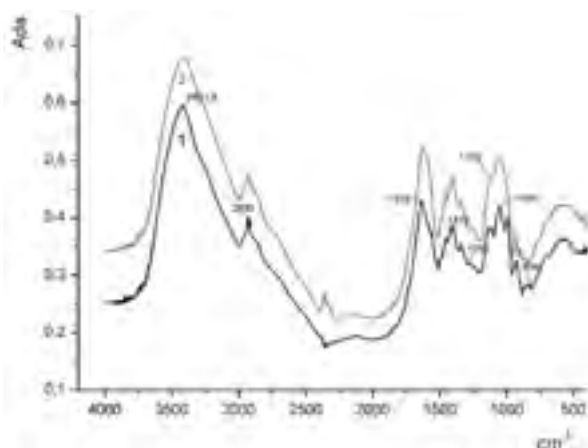


Рис. 2. ИК-спектры культуральной жидкости *A. Vinelandii*:
1 – культуральная жидкость *A. vinelandii* Д-05;
2 – озонированная культуральная жидкость

На заключительном этапе нашей работы мы получали биокомпозиаты, состоящие из опилок, озонированной культуральной жидкости, 5% лигносульфоната и 2% жидкого стекла для уменьшения водопоглощения. Результаты определения физико-механических параметров биокомпозиатов представлены в таблице 3.

Таблица 2

Физико-механические свойства биокомпозиционных материалов с добавлением биосвязующего и 5% лигносульфоната

Плотность, кг/м ³	Предел прочности, МПа	Водопоглощение, %	Разбухание по толщине, %
296,6±4,8	17,0±0,8	58,8±3,3	43,2±2,3

Таблица 3

Физико-механические показатели биокомпозиционного материала на основе озонированной культуральной жидкости с добавлением лигносульфоната и жидкого стекла

Плотность, кг/м ³	Предел прочности, МПа	Водопоглощение, %	Разбухание по толщине, %
1302,5±11,6	20,0±0,9	41,8±2,4	33,0±2,3

По данным таблицы можно отметить, что все показания улучшились. В итоге можно сказать, что использование полисахарида альгината в качестве связующего позволяет получить прессованные биокомпозиционные материалы, которые по прочности не уступают плитам, изготовленным с применением фенолформальдегидных смол. Совместное использование лигносульфоната и озонированной культуральной жидкости, содержащей альгинат, повышает влагостойкость биокомпозиционных материалов с сохранением прочности.

При горячем прессовании происходит размягчение лигнина и ЛГС, частичное разрушение связей между мономерами ароматического кольца, реакции деметилирования и окисления. Это свидетельствует о том, что сульфогруппы ЛГС вовлекаются в процессы образования связей между древесными частицами и ЛГС. С учетом вышеприведенных изменений можно полагать, что в процессе горячего прессования происходит проникновение сульфогрупп ЛГС в ароматические ядра макромолекулы лигнина древесных частиц, таким образом, ЛГС связывает между собой древесные частицы, вероятно, за счет слабых взаимодействий или чисто механически.

На основе полученных и проанализированных данных можно сделать вывод, что полисахарид альгинат обладает адгезивными свойствами. Озонирование культуральной жидкости и добавление

лигносульфоната в пресс-массу значительно улучшает физико-механические свойства биокомпозиционных материалов.

Выводы:

1. На мелассной среде получили культуральную жидкость *Azotobacter vinelandii* с содержанием полисахарида 6,5 г/л и вязкостью 0,5 дПа·сек. При помощи ИК-спектроскопии показали, что при культивировании *A. vinelandii* Д-05 образуется полисахарид альгинат. Об этом свидетельствует наличие полос поглощения в областях 808, 1320 см⁻¹ и 787, 1290 см⁻¹, характерных для маннуроновой и гулурино-вой кислот, которые являются структурными единицами альгината.

2. Озонирование культуральной жидкости привело к появлению карбоксильных групп, что доказывается наличием полос поглощения в области 1180 см⁻¹.

3. Была продемонстрирована возможность использования культуральной жидкости в качестве биологического связующего для получения биокомпозиционных материалов. Величина предела прочности древесно-стружечной плиты при температуре прессования 160 °С составила 11,2 МПа.

4. Добавление к пресс-массе озонированной альгинатсодержащей культуральной жидкости позволило получить биокомпози-ты с улучшенными физико-механическими свойствами.

5. Совместное использование лигносульфоната и культуральной жидкости, содержащей альгинат, повышает влагостойкость биокомпозиционных материалов. Прочность лучших образцов полученных материалов составляла 20 МПа, плотность – 1296 кг/м³. Добавление натриевого жидкого стекла снизило влагопоглощение древесностружечных плит.

Библиографический список

Ивинкина Т.И., Ревин В.В., Шутова В.В. Применение биологического декстрансодержащего связующего для изготовления трехслойных прессованных биокомпозиционных материалов // Вестник Волжского регионального отделения Российской академии архитектуры и строительных наук. 2012. Т. 15. С. 161–166.

Ревин В.В., Шутова В.В., Кадималиев Д.А. и др. Теоретические и прикладные основы получения биокомпозиционных материалов с помо-

- цью биологических связующих : монография. Саранск, 2010. 280 с.
- Ревин В.В., Атыкян Н.А., Водяков В.Н., Лияськина Е.В., Кадималиев Д.А., Шутова В.В. Общая биотехнология. Саранск, 2015. 604 с.
- Ревин В.В., Шутова В.В., Новокупцев Н.В. Биокмпозиционные материалы на основе ультрадисперсных частиц древесины и левана, полученного путем микробного биосинтеза *Azotobacter vinelandii* Д-08 // Фундаментальные исследования. 2016. № 1. С. 53–57.
- Шутова В.В., Ревин В.В. Химическая модификация декстрансодержащей культуральной жидкости для получения адгезивов // Актуальная биотехнология. 2014. № 3 (10). С. 118–119.
- Chandia N.P., Matsuhira B., Vásquez A.E. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy // *Carbohydrate Polymers*. 2001. Vol. 46. № 1. P. 81–87.
- Chèze-Lange H., Beunard D., Dhulster P., Guillochon D., Cazé A. M., Morcellet M. et al. Production of microbial alginate in a membrane bioreactor // *Enzyme and microbial technology*. 2002. Vol. 30. №. 5. P. 656–661.
- Dragnet K. I., Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications // *Food Hydrocolloids*. 2011. Vol. 25. №. 2. P. 251–256.
- Gimmestad M. et al. Identification and characterization of an *Azotobacter vinelandii* type I secretion system responsible for export of the AlgE-type mannuronan C-5-epimerases // *Journal of bacteriology*. 2006. Vol. 188. №. 15. P. 5551–5560.
- Hay I. D. et al. Genetics and regulation of bacterial alginate production // *Environmental microbiology*. 2014. Vol. 16. №. 10. P. 2997–3011.
- Larkin P.J. Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. San Diego, 2011. 230 p.
- Leal D., Matsuhira B., Rossi M., Caruso F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds // *Carbohydr. Res*. 2008. Vol. 343. № 2. P. 308–316.
- Liu Y., Zhao X. R., Peng Y. L., Wang D., Yang L., Peng H., Wang D. Y. Effect of reactive time on flame retardancy and thermal degradation behavior of bio-based zinc alginate film // *Polymer Degradation and Stability*. 2016. Vol. 127. P. 20–31.
- Revin V.V. Kostina E.G., Revina N.V., Shutova V.V. Effect of Nutrient

Sources on the Alginate Accumulation in the Culture Liquid of *Azotobacter vinelandii* D-05 and Obtaining Biocomposite Materials // Brazilian Archives of Biology and Technology. 2018. Vol. 61.

Revin V.V., Shutova V.V. Adhesives on the base of modified *Leuconostoc mesenteroides* cultural fluid // Journal of Biotechnology. 2015. Vol. 208.

Revin V.V., Shutova V.V., Novokuptsev N.V. Biocomposite materials from lignocellulose raw materials and levan produced by *Azotobacter vinelandii* // Journal of Biotechnology. 2016. Vol. 231.

Subramanian V., Ganapathi K., Dakshinamoorthy B. FT-IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR Spectroscopy of alginate extracted from turbinaria decurrens (Phaeophyta) // World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015. Vol.4. №. 12. P. 761–771.

Tian G., Ji Q., Xu D., Tan L., Quan F., Xia Y. The effect of zinc ion content on flame retardance and thermal degradation of alginate fibers // Fiber Polym. 2013. Vol.14. № 5. P. 767–771.

УДК: 57.04

Е.С. Яценко¹, С.С. Бойко¹, Р.М. Яценко²

¹Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

²Московский государственный технический университет
им. Н.Э. Баумана (Москва, Россия)

Оптимизация метода определения численности жизнеспособных спорных бактерий

Особенностью использования и производства пробиотических препаратов, содержащих живые микроорганизмы, является сохранение заявленной производителями численности микроорганизмов в течение всего срока годности. Эффективность, безопасность и точность методов контроля численности не всегда соответствуют технологическим требованиям. Результаты представленных экспериментальных исследований относятся к микробиологии, биотехнологии

и могут быть использованы для уменьшения времени активации и повышения эффективности и безопасности метода количественного определения жизнеспособных клеток *Bacillus subtilis*. Метод определения количества жизнеспособных клеток *Bacillus subtilis* является основным в процессе технологического контроля и контроля качества готовой продукции биологических препаратов. Искажение его результатов негативно скажется на технологическом процессе и качестве биопрепарата. Активация ультразвуком в течение 15–20 с способствует ускоренному выходу *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 из спор за счет механического повреждения споры, т.е. через 40 минут, к окончанию процесса десятикратных разбавлений, 95–99% спор перейдет в вегетативное состояние. Без активации процесс выхода из спор занимает 2–3 часа. При активации более 20 с начинается рост численности микроорганизмов за счет стимулирующего действия ультразвука со 100 до 151%. Это приводит к искажению данных об исходном количестве спор в пробе.

Таким образом, оптимальное время активации спор бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 ультразвуком при температуре 32–34 °С, частоте колебаний 35–37 кГц и мощности 140 Вт составляет 15–20 с. Предложенный способ позволяет: уменьшить время активации с 15 мин до 15–20 с; устраняется стадия прогрева на водяной бане, что повышает безопасность работ; после разведения на твердую агаризованную среду будут высеяны вегетативные клетки, а не споры, что повышает точность результатов и соответствует методу Коха.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, определение численности микроорганизмов, ультразвук.

Введение. Особенностью использования и производства пробиотических препаратов, содержащих живые микроорганизмы, является сохранение заявленной производителями численности микроорганизмов в течение всего срока годности. Эффективность, безопасность и точность методов контроля численности не всегда соответствуют технологическим требованиям.

Экспериментальные результаты относятся к микробиологии, биотехнологии и могут быть использованы для уменьшения времени

активации и повышения эффективности и безопасности метода количественного определения жизнеспособных клеток *Bacillus subtilis*. Метод определения количества жизнеспособных клеток *Bacillus subtilis* является основным в процессе технологического контроля и контроля качества готовой продукции биологических препаратов. Искажение его результатов негативно скажется на технологическом процессе и качестве биопрепарата.

Цель – разработка быстрого, безопасного, эффективного метода активации спор бактерий *Bacillus subtilis* в процессе определения количества жизнеспособных клеток бактерий споровых микроорганизмов *Bacillus subtilis*.

Препараты на основе *Bacillus subtilis* используются для получения пробиотических средств, биоконсервантов, биологических фунгицидов, биологических дезинфектантов и. т.д. Штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 составляет основу кормовой добавки «Энзим-спорин». Поскольку количество жизнеспособных микроорганизмов в готовом продукте является одним из важных показателем его качества, искажение этих результатов недопустимо.

Известен способ определения количества живых микроорганизмов (метод Коха), заключающийся в высеве микробных суспензий на плотную питательную среду. Данный способ включает в себя последовательные десятикратные разведения микробной суспензии, высев конечного разведения на плотную питательную среду, инкубацию в условиях, определяемых видом микроорганизма, подсчет выросших колоний и определение количества живых клеток в единице объема исследуемой микробной суспензии (Луста, 1990). Особенностью является то, что не учитывается специфика спорообразующих микроорганизмов, так как спорообразующим бактериям (в том числе *Bacillus subtilis*) для прорастания споры необходимо 2–3 часа в обычных условия или активация перед приготовлением суспензии (Ноздрин, 2005).

Материалы и методы. Определение количества жизнеспособных клеток бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 проводят путем высева соответствующего разведения пробы на агаризованную среду. Для этого от каждой партии биопрепарата отбирают навеску массой 1,0 г. Отобранные пробы в асептических условиях разводят стериль-

ным физиологическим раствором в пробирках объемом 10 мл. Содержимое пробирок перемешивают до гомогенной суспензии на водяной бане при температуре 80 °С, в течение 15 мин. Из полученной взвеси готовят серию десятикратных разведений. Из двух последних разведений делают высевы на чашки Петри. Чашки с посевом помещают в термостат на 24 часа при температуре 37 °С.

Недостатками данного метода являются:

- 1) трудоемкость;
- 2) опасность работы с горячей водяной баней;
- 3) затраты времени для подготовки водяной бани, прогрева пробирок и охлаждения пробирок до комнатной температуры.

А также, если для приготовления суспензии использовали споры, которые были активированы кратковременным прогреванием, то это может привести к увеличению процента проросших спор. В свою очередь это может исказить результат анализа готового биологического продукта.

Способ осуществляется следующим образом.

0,1 г сухих спор *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 помещают в асептических условиях в стерильную микропробирку на 1,5 мл, которую плотно закрывают. Затем производят активацию спор ультразвуком при температуре 32–34 °С, частоте колебаний 35–37 кГц и мощности 140 Вт 15–20 с. Для обработки спор может быть использована любая ультразвуковая установка, советующая выше заявленным параметрам. Затем в микропробирку добавляют 1 мл жидкой питательной среды, которую предварительно готовят при следующем соотношении компонентов (г/л): пептон ферментативный – 15, дрожжевой экстракт – 5, натрий хлористый – 5, остальное – дистиллированная вода. Значение pH 7,0–7,2. Стерилизация при 1,1 атм. в течение 40 мин.

Затем 1 мл суспензии из микропробирки переносят в пробирку с 9 мл раствора хлорида натрия с массовой долей хлорида натрия 8,5 г/л, далее производят разбавление стандартным методом последовательных десятикратных разведений с высевом в чашки Петри со стандартной агаризованой средой. Чашки помещаются в термостат на 24 часа, температура 37 °С. Затем осуществляется подсчет колоний с учетом разведений и навески сухих спор.

Далее, методом микрокопирования оценивалось, какое количество спор и вегетативных клеток, вышедших из спор, в процессе активации ультразвуком, находится в пробе, в зависимости от времени воздействия ультразвука на споры. Количество микроорганизмов *Bacillus subtilis* ВКПМ- В-12079 определялось для каждой пробы стандартным методом десятикратных разведений (метод Коха) после проведения активации. Все опыты проводились в семикратном повторении.

Результаты и обсуждения. Из приведённых данных видно (табл.), что активация ультразвуком в течение 15–20 с способствует ускоренному выходу *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 из спор за счет механического повреждения споры, т.е. через 40 минут, к окончанию процесса десятикратных разведений 95–99% спор перейдет в вегетативное состояние.

Зависимость количества микроорганизмов, времени выхода из спор от времени активации ультразвуком

Воздействие УЗ, с	-	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Время, при котором происходит выход из спор не менее 95%, мин	120	120	50	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
КОЕ, n* 1011	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64	1,68	1,72	1,83	2,15	2,16	2,38	2,43	2,48
КОЕ, %	100	100	100	100	100	103	104	112	131	132	145	148	151

Без активации процесс выхода из спор занимает 2–3 часа. В этом случае на твердую агаризованную среду происходит высеив спор, а не вегетативных клеток, что может исказить результат. А при активации более 20 с начинается рост численности микроорганизмов за счет стимулирующего действия ультразвука со 100 до 151%. Это приводит к искажению данных об исходном количестве спор в пробе.

Выводы. Оптимальное время активации спор бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 ультразвуком при температуре 32–34 °С, частоте колебаний 35–37 кГц и мощности 140 Вт составляет 15–20 с.

Предложенный способ позволяет:

- 1) уменьшить время активации с 15 минут до 15–20 с;
- 2) устраняется стадия прогрева на водяной бане, что повышает безопасность работ;
- 3) после разведения на твердую агаризованную среду будут высеяны вегетативные клетки, а не споры, что повышает точность результатов и соответствует методу Коха.

Библиографический список

Луста К.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов. Пущино, 1990.

Ноздрин Г.А. Научные основы применения пробиотиков в птицеводстве. Новосибирск, 2005.

**ЛЕСНАЯ И ПРИРОДООХРАННАЯ
БИОТЕХНОЛОГИЯ**

УДК 633.112.1:632.4

Н.В. Барышева¹, Л.П. Хлебова², И.А. Брумберг²

¹Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий
(Барнаул, Россия)

²Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Биотехнологические подходы к оценке патогенной микобиоты семян твердой пшеницы

Выполнен микологический анализ семян яровой твердой пшеницы, сформированных в условиях лесостепной зоны Приобья Алтайского края в полевую вегетацию 2016 г. Установлено значительное заселение зерна патогенными грибами родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* (98%). Доля представителей родов *Penicillium* и *Aspergillum* составила 2%. Выявлено отрицательное влияние фузариевых грибов на всхожесть семян. Распространенность черного зародыша определяется присутствием в зерне мицелия *Bipolaris sorokiniana*.

Ключевые слова: яровая твердая пшеница, семена, черный зародыш, распространенность, микологический анализ, патогенная микобиота.

Исторически Россия играла значимую роль в мировом производстве твердой пшеницы, обеспечивая как собственные потребности в сырье для получения высококачественных макарон, так и экспортируя зерно за рубеж (Розова и др., 2015). В настоящее время производство твердой пшеницы не способно обеспечить сырьем перерабатывающие предприятия, особенно остро стоит вопрос качества производимого зерна. Доля высококачественной твердой пшеницы (первого и второго классов) составляет незначительную часть от общего количества получаемого урожая (Бутковский, 2004).

Неудовлетворительное фитосанитарное состояние посевов и семян является одной из причин снижения реализации потен-

циальной продуктивности и качества зерна данной культуры. В годы эпифитотий и массового размножения вредных организмов урожай погибает полностью или становится непригодным для использования из-за низкого качества, в том числе повышенного содержания токсинов, угрожая продовольственной безопасности регионов и стран (Торопова и др., 2011). Патологический процесс в агроэкосистемах определяется заселением почв фитопатогенами, микocenотическим составом семян сельскохозяйственных культур, генотипическими особенностями возделываемых сортов, климатическими условиями региона в целом и условиями вегетации в частности. Таким образом, микocenотический состав семян как один из компонентов патологического процесса требует тщательного изучения.

Целью настоящего исследования явилась оценка патогенного комплекса грибных микроорганизмов семян яровой твердой пшеницы, сформированных в условиях лесостепной зоны Приобья Алтайского края в полевую вегетацию 2016 г.

Материалы и методы. В исследование были включены 9 сортов *Triticum durum* Desf. Сорта селекции Алтайского НИИ сельского хозяйства (Солнечная 573, Салют Алтая, Алейская) и СибНИИСХ (Омский корунд, Омский изумруд) внесены в Государственный реестр (2018 г.) и допущены к использованию по 10-му региону для производства твердой пшеницы. Остальные пять образцов различного эколого-географического происхождения являются материалом коллекции лаборатории селекции твердой пшеницы Алтайского НИИСХ. Сорты Марина и Безенчукская золотистая созданы в Самарской области, а Луч 25 и Саратовская золотистая – в Саратовской области. Материал получен в 2016 г. на стационаре лаборатории селекции твердой пшеницы Алтайского НИИСХ, расположенного в Приобской лесостепи Алтайского края. Семена для анализа отбирали в соответствии с ГОСТ 12044–93.

Подготовку проб твердой пшеницы для микроскопического анализа проводили методом влажной камеры с применением бумажных рулонов. Подготовленные рулоны помещали в термостат при температуре 22 °C на 5–7 суток. Микроскопический анализ цитологических препаратов выполняли на микроскопе МикМед в лабора-

тории микробиологии Алтайского государственного университета. Для изоляции фитопатогенов в чистую культуру предварительно семена в течение нескольких минут стерилизовали раствором KMnO_4 , прополаскивали стерильной дистиллированной водой и асептически по 10 штук помещали в стерильные чашки Петри на картофельно-морковный агар (КМА). Инкубацию материала проводили при естественном освещении и комнатной температуре. Отсев изолятов осуществляли в ламинарном боксе путём переноса стерильной иглой отдельных конидий (у видов с крупными одиночными конидиями) или нескольких конидий из одной цепочки в чашки Петри с КМА. Процесс переноса контролировали под бинокуляром.

Распространенность черного зародыша определяли как процент пораженных семян от общего числа проанализированных. Макроскопический анализ семян проводили по шкале А.Т. Троповой (в изложении Е.Ю. Тороповой, А.А. Кириченко) (Торопова и др., 2011). Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета прикладных программ *Microsoft Excel 2010*.

Результаты и обсуждение. Микологический анализ семян обнаружил представителей родов *Bipolaris* Shoemaker (*Helminthosporium* Link), *Alternaria* Nees, *Fusarium* Link, *Penicillium* Link и *Aspergillum*, с преобладанием (98%) трех первых. Первые три таксона относятся к группе патогенных грибов. Микромицеты *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium* spp. – наиболее распространенные возбудители корневых гнилей, ежегодные потери от данного заболевания составляют 15–20% урожая зерна пшеницы и ячменя. Заселение зерна грибами рода *Fusarium* сопровождается его токсикацией. Известно, что распространение альтернариоза не оказывает влияния на зерновую продуктивность. Однако некоторые виды *Alternaria* вырабатывают токсины (Ганнибал, 2011). Присутствие в биоценозе этих трех патогенов часто связывают с распространением такого заболевания зерна, как черный зародыш. Особое значение резистентность к черному зародышу имеет для твердой пшеницы. Черный зародыш существенно влияет на качество макарон, так как пораженное им зерно при размоле имеет в крупке значительную долю темных вкраплений – спексов (Dexter, Matsuo, 1982). Заселение семян патогенами представлено в таблице.

Поражение семян яровой твердой пшеницы различными фитопатогенами и черным зародышем (ЧЗ) в 2016 г., %

Образец	Поражение			Распространенность ЧЗ, %	Всхожесть, %
	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Alternaria spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>		
Салют Алтая	41	64	34	35,5	50
Солнечная 573	37	55	76	23,3	37
Алейская	49	59	73	46,0	36
Омский корунд	49	55	28	38,5	58
Омский изумруд	40	58	56	22,0	36
Луч25	66	59	62	53,5	43
Саратовская золотистая	47	57	63	78,8	51
Марина	49	51	81	40,8	45
Безенчукская золотистая	42	48	75	64,8	41
Среднее	46,7	56,2	60,9	44,8	44,1

Доминирующими в семенах оказались фузариевые грибы, встречаемость которых в среднем по образцам составила 60,9%. Следующими по встречаемости явились виды рода *Alternaria* – 56,2%. Род *Helminthosporium* был представлен одним видом *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (syn. *Helminthosporium sativum* Pam., King et Bakke, *H. sorokiniana* Sacc.), доля пораженных семян которым составила 46,7%. Чаще всего грибы встречались одновременно в одних и тех же пораженных семенах, формируя микобиотический патогенный комплекс.

Условия вегетации 2016 г. способствовали распространению черного зародыша. В среднем по девяти сортам распространенность черноты зародыша составила 44,8%, варьируя от 22,0 (Омский изумруд) до 78,8% (Саратовская золотистая). В предыдущие два года дан-

ное заболевание было распространено в пять раз реже (Барышева и др., 2017). Было интересно оценить развитие черного зародыша при присутствии в зерновке мицелия грибов разных родов. Анализ взаимосвязей между различными представителями патокомплекса семян и распространенностью черного зародыша показал статистически значимое влияние ($r = 0,38$) присутствия *B. sorokiniana*. Влияние степени заселения видами *Alternaria* ($r = -0,24$) и *Fusarium* ($r = 0,19$) было не существенным.

В нашем исследовании мы наблюдали низкую лабораторную всхожесть образцов. Установлена отрицательная корреляция между всхожестью и пораженностью семян фузариевыми грибами ($r = -0,69$). Полученные результаты согласуются с данными других авторов о снижении всхожести зерна при поражении фузариозом (Гагкаева и др., 2012).

Заключение. Микологический анализ семян твердой пшеницы урожая 2016 г. обнаружил их значительное заселение патогенными грибами родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*. Доля представителей родов *Penicillium* и *Aspergillum* составила 2%. Выявлено отрицательное влияние фузариевых грибов на всхожесть семян. Распространенность черного зародыша определяется присутствием в зерне мицелия *Bipolaris sorokiniana*.

Библиографический список

- Барышева Н.В., Розова М.А., Зиборов А.И., Хлебова Л.П., Крайнов А.П. Устойчивость селекционного материала яровой твердой пшеницы Алтайского селекцентра к черному зародышу // Актуальные разработки для АПК Алтайского края. Барнаул, 2017. С. 50–61.
- Бутковский В.А. Состояние и перспективы рынка муки и крупы // Зерновая индустрия в XXI веке : материалы II Междунар. конф. М., 2004. С. 23–31.
- Гагкаева Т.Ю., Ганнибал Ф.Б., Гаврилова О.П. Зараженность зерна пшеницы грибами *Fusarium* и *Alternaria* на юге России в 2010 г. // Защита и карантин растений. 2012. № 1. С. 37–41.
- Ганнибал Ф.Б. Мониторинг альтернариозов сельскохозяйственных культур и идентификация грибов рода *Alternaria*. СПб., 2011. 71 с.
- Розова М.А., Зиборов А.И., Егiazарян Е.Е., Барышева Н.В. Актуаль-

ные направления селекционных исследований по яровой твердой пшенице // Актуальные вопросы АПК Сибири: итоги и перспективы (к 65-летию Алтайского НИИ сельского хозяйства) : сб. науч. ст. Барнаул, 2015. С. 136–150.

Торопова Е.Ю., Кириченко А.А. Фитосанитарный экологический мониторинг : метод. указания. Новосибирск, 2012. 38 с.

Торопова Е.Ю., Стецов Г.Я., Чулкина В.А. Эпифитотииология / под ред. А.А. Жученко, В.А. Чулкиной. Новосибирск, 2011. 711 с.

Dexter J.E., Matsuo R.R. Effect of smudge and black point, mildewed kernels, and ergot on durum wheat quality // Cereal Chem. 1982. Vol. 59. N 1. P. 63–69.

УДК 502.62/.23

А.Я. Бондарев¹, Д.Ю. Гаврилова²

¹ФГБУ «Центрохотконтроль» (Москва, Россия)

²Уральский государственный лесотехнический университет (Екатеринбург, Россия)

Оптимизация агроландшафтов – важнейшая экологическая и биотехническая задача

Лесополосы на Алтае является важнейшим стабилизирующим фактором, оказывающим существенное влияние на всю региональную экосистему. Они имеют существенное социальное значение, являясь охотничьими угодьями, местом сбора грибов и ягод. Современные энергосберегающие технологии в растениеводстве позволяют снизить иссушение пашни и избежать других негативных последствий. При ведении хозяйства необходимо активно формировать и сохранять среду обитания и видовую структуру фито- и зоо-сообществ. С учетом общеэкологических концепций необходимо административно-правовыми усилиями организовать и обеспечивать формирование оптимальных ландшафтов.

Ключевые слова: агроландшафты, лесополосы, стабилизация, экосистема, экологическая и биотехническая задача.

Организация Объединенных Наций главным условием выживания человечества провозгласила достижение устойчивости экосистем. Примечательно и тревожно, что юг Западной Сибири и Казахстан подвергаются аридизации из-за соседства со среднеазиатскими пустынями. Высыхание там крупнейших водоемов – Арала и Балхаша усугубляет ситуацию и служит красноречивым сигналом надвигающейся опасности.

Известно, что сложные экосистемы устойчивы против разрушений и в долговременном плане обычно более продуктивны, нежели упрощенные. В 1970–1990-х гг. в Казахстане была внедрена почвозащитная система академика А. Бараева, с помощью которой удалось прекратить дальнейшую деградацию степных экосистем. В Алтайском крае эта система была дополнена посадками полезащитных лесополос на площади около 200 тыс. га. Теперь эти лесополосы – важнейший элемент, стабилизирующий экосистемы. Лесополосы к тому же имеют существенное социальное значение как охотничьи угодья, место сбора грибов, ягод. В Чувашии был накоплен ещё более впечатляющий опыт по осуществлению природоохранных мероприятий при одновременном увеличении производства сельскохозяйственной продукции. Например, в колхозе «Ленинская Искра», с общей площадью сельхозугодий 5,7 тыс. га, прежде отсталом, имевшем более 80% эродированных земель, густую сеть действующих оврагов и самую низкую в районе урожайность зерновых культур (6–8 ц/га), за три пятилетки (к 1982 г.) был осуществлен комплекс агротехнических, лесомелиоративных и гидротехнических противоэрозионных мероприятий. Основное внимание уделяли борьбе с эрозией почв, борьбе с оврагами и их образованием. Большинство оврагов было укреплено по дну системой фашинных и плетеных запруд, после чего засажены ивой, тополем, ольхой и другими насаждениями. На склонах оврагов провели лесопосадки на площади 185 га, которые надежно защищают и облагораживают землю, стали средой обитания для многих животных. На оврагах со значительным водосбросом построили каскад из 54 прудов общей площадью 90 га, вода которых ис-

пользовалась для орошения и рыбохозяйственных целей. Учитывая, что 80 % всех цветковых растений образуют семена и плоды только при помощи насекомых-опылителей, колхоз проводил большую работу по сохранению полезных насекомых, в том числе шмелей. Для этого в колхозе были созданы 9 энтомологических заказников. В результате поощрительных мер количество пчелосемей в хозяйстве и у населений увеличилось многократно и достигло 760. В колхозе и на частных подворьях не применяли химические средства борьбы с насекомыми-вредителями и другие ядохимикаты.

В итоге урожайность зерновых культур в хозяйстве увеличилась в четыре раза (до 28,5 ц/га), производство мяса – на 32%, молока – на 62 %, рыбы – до 25–30 тонн. Колхоз стал высокорентабельным.

Современные энергосберегающие технологии растениеводства с поверхностным рыхлением плодородного слоя предопределяют возможности для формирования более сложных экосистем в агроландшафтах на месте экосистем, разрушенных или обедненных прежними формами земледелия: глубокой вспашкой с оборотом пласта, черным паром и пр. Новые технологии позволяют снизить иссушение пашни и избежать других негативных последствий. Например, уборка урожая осуществляется без скашивания – очесыванием колосьев и шляпок подсолнечника с сохранением стеблей растений по всему полю. А это более равномерное распределение снежного покрова, что затрудняет его раннее, преждевременное таяние. За счет сокращения ветровой эрозии почвы снег белым сохраняется до конца зимы и зимой меньше испаряется за счет инсоляции. К тому же в высокой стерне снег рыхлый, поэтому в его толще происходит минимальный теплообмен, а это благоприятно воздействует на сохранение озимых культур, размещенных неширокими полосами. После снеготаяния всходы озимых словно кулисы будут защищать соседнюю пашню от эрозии и весенних сухоев.

Технологии подготовки почвы и посева зерновых также способствуют уменьшению ветровой и водной эрозии. Современные однократные ранневесенние обработки пашни дают возможность птицам более успешно загнеститься и вывести молодняк.

Обилие растительных остатков на поверхности пашни предотвращает иссушение и весеннюю эрозию почвы, обеспечивает кор-

мами фитофагов в наименее кормный период. В слабо уплотняемых техникой почвах хорошая аэрация, что важно для благополучного существования в первую очередь полезных беспозвоночных – почвообразователей. Видовое многообразие и общую биомассу животных можно рассматривать как индикатор благополучия аграрных экосистем.

Вместе с тем количество беспозвоночных и позвоночных животных на полях можно существенно увеличить специальными мероприятиями, а также сохранять, учитывая их жизненные потребности, при проведении технологического цикла работ.

Для большинства наземных позвоночных, обитателей открытых пространств, главным фактором смертности является гибель в режущих частях сельхозмашин, а также отравление химикатами. Обитание птиц и зверей в лесополосах затруднено из-за отсутствия в них водопоев. Для создания водопоев можно воспользоваться изобретением И. Алешкова «Парус, качающий воду». Это устройство отличается дешевизной в изготовлении и работает за счет ветра.

Система сбережения на полях дичи разрабатывалась применительно к старым приемам земледелия. Но многое из тех наработок вполне приемлемо и при внедрении энергосберегающей технологии. Например, уборка урожая от центра поля «в разгон» обеспечивает выпугивание дичи в окрестные угодья и предотвращает ее массовую гибель в режущих частях сельхозмашин. Но агрегаты АУК-4 – прицепные, поэтому, начиная уборку с центра поля, колеса трактора будут приминать часть колосьев. Может быть, стоит мириться с этим и считать это зерно не потерями, а подкормкой фауны?

При организации серийного производства новой техники необходимо ее комплектовать приспособлениями, отпугивающими зверей и птиц (звуковыми и механическими). Это будет соответствовать требованиям Закона РФ «Об охране животного мира».

С учетом общеэкологических концепций целесообразно организовать и обеспечивать экономически и административно – правовыми усилиями – формирование оптимальных ландшафтов. Эти мероприятия не имеют очевидного, прямого отношения к новой технологии, но необходимы как элемент долговременного природопользования. Основные его условия:

- 1) повышение влагозапасов на полях;
- 2) ландшафты должны быть мозаичными, иметь лесистость, способствующую увеличению количества осадков, предотвращать эрозию почв и оврагообразование;
- 3) сток поверхностных вод должен быть зарегулирован;
- 4) создание рукотворных и сохранение естественных водоемов в засушливой зоне благоприятно и для поддержания высокого уровня грунтовых вод, и для полива, и как водопои для фауны и скота, и как место размножения околоводных и водных животных.

Каждая компонента биоты может быть трансформирована в сторону оптимизации условий существования конкретных видов фауны и флоры, в первую очередь эндемиков и краснокнижников. Целесообразно вменить земледельцам обязанность создавать возможность побочным пользователям – охотничьим обществам проводить за свой счет и своими силами работы, направленные на обогащение фауны охотничьих животных. Для этого необходимы нормативные акты и условия, понуждающие основных землепользователей руководствоваться пословицей: «Не хлебом единым жив человек!». И активно формировать, и сохранять оптимальные экосистемы (видовую структуру фито и зоообществ и среду их обитания). Многие не охотничьи и в первую очередь беспозвоночные животные – незаменимые помощники земледелия. А куропатки и фазаны – почти единственные из птиц, способные уничтожать колорадского жука.

Задача прикладной науки – объяснить и доказать хозяевам земли ценность и важность формирования и сохранения сложных, многообразных экосистем и рекомендовать способы и пути достижения этих целей. Задача законодателей – юридически закрепить эту норму природопользования.

Общеизвестно, что многие животные и растения исчезают с обширных пространств, лишившись так называемых ключевых угодий, это обычно небольшие по площади участки, наиболее ценные для выживания, сохранения биологических существ. Такие урочища хорошо известны любителям природы и охотникам. Часть их вошла в особо охраняемые территории. Но неприкосновенность этих местообитаний не достигнута. И вновь законодатель может прийти на помощь природе!

Особая ценность – водно-болотные компоненты биоты. Известно, что они наиболее продуктивны и имеют первостепенное ландшафтообразующее значение. В регионах с древними цивилизациями водно-болотные угодья не разрушают – там люди научились получать урожаи биомассы, несопоставимые с урожаем на суше.

При продаже или передаче земель в частную собственность важно провести инвентаризацию и паспортизацию наиболее ценных для фауны и редкой флоры угодий и законодательно обеспечить им статус неприкосновенности вплоть до вывода из частных землевладений в государственный резервный фонд. Это пока еще возможно сделать, так как конкретные наделы (паи) за индивидуальными владельцами земли во многих районах все еще не закреплены.

Предлагаемые мероприятия необходимо подкрепить специальными исследованиями, рядом организационно-правовых и экономических мер. А проблемы предотвращения аридизации заслуживают межрегионального и межгосударственного обсуждения и решения (Россия и Казахстан). Желательна также целевая программа, в которой гибкая ресурсосберегающая технология выращивания продукции растениеводства займет достойное место.

УДК 574.34 + 504.062

О.В. Бычкова¹, А. Оразов²

¹ Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

² Восточно-Казахстанский государственный университет
им. С. Аманжолова (Усть-Каменогорск, Казахстан)

Использование биотехнологических методов для сохранения редких и исчезающих видов растений

Представлены основные подходы к сохранению редких и исчезающих видов растений с использованием методов биотехнологии.

Ключевые слова: биотехнология растений, лекарственное сырье, сохранение ex-situ, in vitro технологии, банк семян, криосохранение.

Существует неоспоримый интерес к традиционной и альтернативной медицине во всем мире (Matthys et al., 2007), и в то же время все большее количество лекарственных трав применяется в медицинских целях, о чем сообщает Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) (World Health Organization..., 2005). Многовековая традиция применения лекарственных растений превратилась в высокорентабельный бизнес на мировом рынке. Было выпущено множество форм лекарственных трав, таких как запатентованные медицинские товары, пищевые добавки, травяные чаи, экстракты, эфирные масла и т.д. (Lange, 1998, 2002, 2004).

В настоящее время наблюдается рост спроса на лекарственные препараты и лекарственные растения на мировом рынке. Доход конца 1990-х гг. на североамериканском рынке сбыта лекарственных растений составлял около трех миллиардов долларов в год (Glaser, 1999). Бразилия занимает лидирующие позиции в Южной Америке с 160 миллионами долларов в 2007 г., тогда как в Азии Китай находится в списке лидеров на рынке с 14 миллиардами долларов за 2005 год и т.д. (Inamul, 2004). Увеличение доходов наблюдалось в Западной Европе в течение двух лет с 2003 по 2004 г. до шести миллиардов долларов. Продажи в Чешской Республике выросли на 22% с 1999 по 2001 г. и дважды выросли в Болгарии (World Health Organization..., 2010a).

Лекарственные растения являются неотъемлемой частью мировой флоры. Сообщается, что более 80 000 видов из 2 500 000 высших растений на Земле имеют по крайней мере некоторую лекарственную ценность, около 5 000 видов обладают специфической терапевтической ценностью. Современная фитотерапия и современная аллопатическая медицина используют сырье из более чем 50 000 видов растений (World Health Organization..., 2010b).

Около двух третей из этих 50 тысяч растений, используемых в фармакологической промышленности, собирают в естественных местах обитания (Edwards, 2004). Небольшая доля – 10–20% растений, используемых для приготовления лекарств, культивируются в полях или в контролируемых условиях (Vines, 2004).

Плохое управление заготовкой и недостаточная практика культивирования могут привести к полному исчезновению исчезающих видов или уничтожению природных ресурсов. Экологи уже зафиксировали уменьшение естественных популяций, утрату генетического разнообразия, локальное исчезновение многих видов и / или дегенерацию их естественных мест обитания (Peter et al., 2005).

Сохранение генетических ресурсов растений уже давно реализуется как неотъемлемая часть сохранения биоразнообразия. Существует два метода сохранения генетических ресурсов растений, а именно сохранение *in situ* и *ex situ*. Сохранение *ex situ* предполагает сохранение за пределами естественной среды обитания и обычно используется для защиты населения, подвергающегося опасности разрушения, замещения или ухудшения. Подходы к сохранению *ex situ* включают такие методы, как хранение семян, хранение ДНК, хранение пыльцы, сохранение *in vitro*, банки генов и ботанические сады (Sarma, 2003).

Банки семян являются наиболее эффективным и эффективным методом сохранения ортодоксальных семян. Это эффективный и компактный способ хранения. Семена помещаются в пакеты и хранятся в среднесрочных хранилищах (поддерживается при температуре от 0 до 50 °C и от 15 до 20% относительной влажности) в качестве активных коллекций. Большая часть материала также помещается в хранилища длительного хранения (при более низких температурах, от -20 до -180 °C). Большинство семенных проб, как ожидается, будут оставаться жизнеспособными в течение 20–30 лет в среднесрочном хранении и до 100 лет в долгосрочном хранении в зависимости от вида, начального качества семян и специфичности среды хранения и общего состояния инфраструктуры (Kasagana et al., 2011).

Полевой банк генов обеспечивает легкий доступ к консервативным материалам для использования. Однако материал подвержен риску разрушения, поэтому для сохранения генетических ресурсов растений все чаще применяют методы биотехнологии. К ним относятся: сохранение *in vitro*; распространение *in vitro* и повторное введение растений в их естественные среды обитания, а также технология молекулярных маркеров. Учеными разработаны несколько методов *in vitro* для хранения вегетативно размножающихся и нерегулярно

дающих семена видов. Они подразделяются на две категории: медленные процедуры роста, где гермоплазма хранится в виде стерильных растительных тканей или самих растений на питательных гелях; и криоконсервация, где растительный материал хранится в жидком азоте. Медленные процедуры роста обеспечивают краткосрочные и среднесрочные варианты хранения, в то время как криоконсервация позволяет долговременное хранение растительного материала (Chamberlain, 1982).

Сохранение гермоплазмы вегетативно размножающихся культур, лесных видов, особенно тех, которые имеют нестабильные семена, в полевых банках генов создают огромные проблемы с точки зрения занимаемого пространства и трудоемкости при ежегодной или многолетней пересадке, тестировании и документации. Преимущество хранения *in vitro* или замедление роста культур включает наличие относительно небольшой территории, необходимой для культуральных комнат для сохранения тысяч генотипов и отсутствия болезней и вредителей в культуральных сосудах. Хотя наиболее экономичные средства хранения гермоплазмы для размножаемых семенами видов находятся в форме семян, это не всегда возможно из-за следующих причин: некоторые культуры не производят жизнеспособных семян; семена остаются жизнеспособными только в течение ограниченного времени и являются непригодными для хранения; семена некоторых видов быстро ухудшаются из-за семенного патогена; некоторые семена гетерозиготные и не пригодны для поддержания исходного генотипа.

Эффективным подходом к решению вышеуказанных проблем может быть применение технологии криоконсервации. «Криоконсервация» определяется как прижизненное замораживание биологического материала и их последующее хранение при сверхнизких температурах (-196°C) с использованием жидкого азота. На сегодняшний день существуют следующие методы криоконсервации: инкапсулирование и обезвоживание, витрификация, инкапсулирование и витрификация, замораживание капель. Системы, к которым применяются методы криоконсервации: недифференцированные растительные клетки, клеточные суспензии, каллус, пыльца, семена, соматические эмбрионы, аддитивные почки (Kasagana et al., 2011).

Культура клеток и ткани растений – это практика, используемая для размножения растений в стерильных условиях, часто для производства клонов растения. Различные методы в культуре тканей растений могут иметь определенные преимущества перед традиционными методами распространения, в том числе: производство точных копий растений; быстрое производство зрелых растений; производство растений при отсутствии семян или необходимых опылителей для производства семян; регенерация целых растений из растительных клеток, которые были генетически модифицированы; производство растений в стерильных контейнерах, что позволяет хранить и обменивать материал со значительно уменьшенными возможностями передачи болезней, вредителей и патогенов; производство растений из семян, которые в противном случае имеют очень низкие шансы на прорастание и рост, например орхидеи; очистить конкретное растение от вирусных и других инфекций и быстро размножить эти растения как «безвирусное» для садоводства и сельского хозяйства.

Применение методов тканевой культуры и криоконсервации часто применяют к видам, которые трудно регенерировать обычными методами и единственный способ спасти их от вымирания – распространять их путем культуры тканей; виды, у которых численность уменьшилось из-за чрезмерной эксплуатации, таким образом, первоначальный объем запасов может быть взят из культуры тканей; виды, которые обладают высокой изменчивостью содержания БАВ. Культура отдельных клонов будет способствовать устойчивому сбору урожая и повышению цен как на внутреннем, так и на международном рынке.

Экземпляры с высоким содержанием активных веществ могут быть идентифицированы в зависимости от их потенциала получения более высокого количества БАВ (Kasagana et al., 2011).

Таким образом, биотехнология растений является важным инструментом для размножения и сохранения находящихся под угрозой исчезновения и редких популяций лекарственных растений. Используя технологии *in vitro*, большое количество идентичных растений можно размножить, регенерировать и перенести обратно в природу, таким образом восстанавливая и расширяя дикие места

обитания. С другой стороны, численность лекарственных растений будет менее уязвимой в результате эксплуатации, если ценное сырье может быть получено альтернативными способами.

В этом смысле путем микроразмножения растений огромное количество биомассы может производиться непрерывно и / или за короткий период времени. Кроме того, производство биологически активных веществ в лабораторных условиях способствует меньшему использованию природных ресурсов и, таким образом, защите видов. Тот факт, что культура *in vitro*, клетки, ткани, органы растений могут вырабатывать метаболиты, специфичные для интактного донорского растения, имеет огромное значение для производства желаемых соединений. Разработка более совершенных инструментов и оригинальных подходов, в том числе биотрансформация и метаболическая инженерия, является революционным методом для высокотехнологичного производства ценных веществ и биологически активных соединений, требуемых для пищевой, фармацевтической и косметической промышленности.

Библиографический список

- Chamberlain D. F., Revision of *Rhododendron* II // Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh. 1982. Vol. 39. N 2. P. 44–48.
- Edwards R. No remedy in sight for herbal ransack // New Science. 2004. N 181. P. 10–11.
- Glaser V. Billion-dollar market blossoms as botanicals take root // Nat Biotechnol. 1999. N 17(1). P. 17–18.
- Inamul Haq. Safety of medicinal plants // Pakistan Journal of Med. Res. 2004. N 43(4). P. 203–210.
- Kasagana V.N., Karumuri S.S., et al. Conservation of medicinal plants (Past, Present & Future Trends) // Pharm. Sci. & Res. 2011. Vol. 3(8). P. 1378–1386.
- Lange D. Europe's medicinal and aromatic plants: Their use, trade and conservation, IUCN, A Traffic Network Report., 1998. P. 77.
- Lange D. Medicinal and aromatic plants: Trade, Production, and Management of Botanical Resources Proc // Future for Medicinal and Aromatic Plants. 2004. N. 629. P. 177–197.
- Lange D. The role of east and southeast Europe in the medicinal and aromatic plants trade // Medicinal Plant Conservation, 2002. N 8. P. 14–18.

Matthys K., Julsing Wim J. Quax Oliver Kayser. The Engineering of medicinal plants: Prospects and limitations of medicinal plant biotechnology. In: Medicinal Plant Biotechnology from basic Research to Industrial Applications. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim., 2007. P. 1–8.

Peter H.C., Thomas H., Ernst E. Bringing medicinal plants into cultivation // Opportunities and challenges for Biotechnol. 2005. N 297. P. 1–5.

Sarma S., Meghalaya, the land and forest. A remote sensing based study. NEHU, Shillong, 2003. 103 p.

Vines G. Herbal harvests with a future: towards sustainable sources for medicinal plants, Plantlife International. 2004. [Electronic resource]. URL: www.plantlife.org.uk

World Health Organization. 2010a. [Electronic resource]. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs-134/en/>

World Health Organization. 2010b. [Electronic resource]. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>

World Health Organization. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines, Report of a WHO global survey, Geneva, Switzerland. 2005. [Electronic resource]. URL: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s7916e/s7916e.pdf>

УДК 630*434:582.475.4

А.А. Маленко, Е.С. Курсикова

Алтайский государственный аграрный университет (Барнаул, Россия)

Результаты использования сеянцев сосны обыкновенной с закрытой корневой системой при облесении крупноплощадных гарей

Жесткие лесорастительные условия юго-западной части ленточных боров Алтайского края губительно сказываются на росте сеянцев

сосны в первые годы роста лесных культур. Частично этим объясняется низкая сохранность лесных культур сосны на четвертый год после посадки (41 %) на площадях со слабовсхолмленным и ровным рельефом. Еще более низкая сохранность (от 23 до 34 %) и худшее состояние сосны наблюдается на площадях со средне и сильно всхолмленным рельефом, который преобладает в лесном фонде региона. Эти результаты значительно ниже, чем в культурах сосны, созданных с открытой корневой системой (51,3%). В культурах, созданных посадочным материалом с закрытой корневой системой, сформировалась поверхностная корневая система. А в культурах, созданных посадочным материалом с открытой корневой системой, – стержневая, что повышает их устойчивость к часто повторяющимся засухам и повышенному ветровому режиму, которые свойственны данному району.

Ключевые слова: сухая степь, лесные культуры, сеянцы сосны, закрытая корневая система, приживаемость, сохранность, рост, корневая система.

Введение. Создание лесных культур посадочным материалом с закрытыми корнями – новое перспективное направление в лесовосстановлении. Его внедрение в производство обещает целый ряд лесоводственно-экономических выгод по сравнению с традиционными лесокультурными технологиями. Однако кажущаяся простота выращивания посадочного материала с закрытой корневой системой и лесных культур с его использованием иногда приводит к отрицательным результатам, особенно в лесорастительных условиях, приближенных к экстремальным.

Накопленный опыт выращивания посадочного материала с закрытой корневой системой и его использование в лесокультурном деле указывает на недопустимость шаблонного подхода в этом деле. Стандартные разработки должны быть адаптированы к конкретным лесорастительным условиям. Для этого необходимо изучить имеющийся опыт выращивания посадочного материала с закрытой корневой системой и его использование при создании лесных культур в регионе.

Объекты и методы исследований. Объектом исследований являются лесные культуры сосны, созданные посадочным материалом

с закрытой корневой системой, выращенным в Бобровском лесном селекционно-семеноводческом центре (ЛССЦ) Алтайского края. Основным регионом использования посадочного материала с закрытой корневой системой является юго-западная часть ленточных боров Западной Сибири, на долю которой приходится 66,5% от всей покрытой лесом площади.

Основная категория лесокультурного фонда – гари разных лет, в том числе и крупноплощадные. Природная зона – сухая степь. Климат – резко континентальный. Основные показатели: средняя годовая температура воздуха – 3,3 °С, средняя температура вегетационного периода – 18,7 °С; сумма тепла за вегетационный период, – 2700–2800 °С; годовое количество осадков – 230–250 мм, вегетационного периода – 110–130 мм; относительная влажность воздуха вегетационного периода – 40–50% (снижается при суховеях до 10%); коэффициент увлажнения (0,05–0,15) приближается к полупустыням; повышенный ветровой режим. Рельеф сложный – от ровного и слабо до сильно всхолмленного. Преобладают боровые почвы дерново-подзолистого типа (гумуса не более 3% в слое 0–20 см), по увлажнению – сухие.

Исследования проведены по методикам, общепринятым в лесокультурном производстве. Расчет сохранности лесных культур проводился на фактически установленной площади, а число сохранившихся и погибших сеянцев сосны – по уточненной схеме посадки с учетом установленной ширины междурядий.

Результаты исследований и их обсуждение. Исследованные нами культуры сосны четырехлетнего возраста созданы сеянцам сосны с закрытой корневой системой, расположены в юго-западной части ленточных боров в пределах сухой степи. Из-за имеющихся различий исследуемые культуры разделены на два блока. Общим для них являются то, что лесокультурная площадь представлена гарями 2001–2010 гг. Почвы дерново-подзолистые песчаные, по увлажнению сухие. Рельеф – средневсхолмленный и ровный, местами слабовсхолмленный. Обработка почвы проведена осенью предшествующего посадке года плужными бороздами плугом ПКЛ-70. Посадка лесных культур проведена в середине апреля 2014 г. ручным способом под посадочную трубу «поттипутки» в дно плужных борозд.

В первый блок входят посадки (ПП-1), занимающие среднюю часть песчаного склона, ориентированного на северо-восток. Схема 2,5×1,0 м обеспечила количество посадочных мест 4,0 тыс. семян на 1 га. Сохранность сосны по завершению четвертого года роста составила 21,3%.

Лесные культуры на второй пробе характеризуются несколько лучшими условиями в сравнении с предыдущими благодаря ровному рельефу. Схема 3,2×1,0 м обеспечила начальную густоту 3,2 тыс. семян на 1 га. Сохранность сосны составила 34,0%.

В культурах в течение первых трех лет отмирание сосны происходило за счет маломерных особей. На отмерших сосенках первого и второго года роста ком с субстратом хорошо сохранился в первоначальных размерах. Развития корневой системы с выходом за пределы кома не просматривалось.

Сосна в исследуемых культурах характеризуется слабым ростом в высоту. Основное количество сосенок в первые три года роста кустиятся и лишь на четвертый год умеют хорошо заметный прирост в высоту. Средняя высота сосны составила 0,35 м, средний прирост за последний год – 14,1 см. В культурах по средне всхолмленному рельефу в течение ближайших нескольких лет будет продолжаться процесс единичного отмирания сосны.

Во второй блок входят культуры сосны, созданные по ровному (слабо всхолмленному) рельефу. Посадки сосны на ПП-4 созданы по схеме 3,0×1,2 м, начальная густота – 2,5 тыс. растений на 1 га. Приживаемость культур первого года роста составила 41,0 %, сохранность сосны по завершению четвертого года роста осталась на прежнем уровне. Культуры сосны характеризуются хорошим ростом. В четырехлетнем возрасте средняя высота сосны составила 51,8 см, а прирост по высоте – 21,4 см. Состояние лесных культур удовлетворительное.

Культуры сосны на пятой пробе при одинаковых с предыдущими посадками исходных схеме и густоте имеют близкую сохранность сосны (40,6 %). Сосна также характеризуется хорошим ростом, но меньшими показателями, чем на четвертой пробе. Состояние лесных культур удовлетворительное.

Культуры сосны на пятой пробе расположены на слабо заметном понижении рельефа. При той же схеме посадки и начальной густоте, а также проведенного дополнения на второй год роста сохранность

культур в четырехлетнем возрасте составила 81,0 %. Сосна характеризуется хорошим ростом. Состояние лесных культур хорошее.

В отличие от предыдущих посадок культуры сосны на седьмой пробе созданы посадочным материалом с открытой корневой системой, выращенном в лесном питомнике Озеро-Кузнецовского лесничества из семян местной репродукции. Посадка механизированная под МЛУ-1, выполнена по схеме 4,0×0,6 м, начальная густота составила – 4,2 тыс. растений на 1 га. С учетом отпада и дополнения густота культур по завершению пятого года роста составила 51,3 % от исходной. Состояние лесных культур хорошее. На всех обследованных площадях, входящих во второй блок, возможно единичное отмирание сосны в ближайшие годы.

Анализ корневых систем, взятых в культурах на 7 пробах, свидетельствует, что сосна в посадках, созданных посадочным материалом с закрытой корневой системой, в четырехлетнем возрасте формирует поверхностную корневую систему. Горизонтальные скелетные корни продлеваются на 0,8 м и более и расположены в верхнем 5–10 см слое почвы. Корни ориентированы как вдоль, так и поперек рядов. Стержневой корень отсутствует, нет никаких признаков его существования. По-видимому, он был утрачен еще в период выращивания посадочного материала. В то же время сосна в пятилетних культурах (проба 7), созданных посадочным материалом с открытой корневой системой, сформировала стержневой корень. Он хорошо выражен среди горизонтальных скелетных корней.

Проведенные исследования и результаты позволяют сделать следующие *выводы*.

1. Культуры сосны, созданные посадочным материалом с закрытой корневой системой, имеют худшую приживаемость, чем культуры сосны, созданные с открытой корневой системой. Сохранность сосны зависит от рельефа лесокультурной площади и составила в четырехлетних культурах на площадях со слабовсхолмленным и ровным рельефом 41 и 23–34 % на площадях со средне и сильно всхолмленным рельефом, что значительно ниже, чем в культурах сосны, созданных с открытой корневой системой (51,3%).

2. В четырехлетних культурах сосны, созданных посадочным материалом с закрытой корневой системой, сформировалась по-

верхностная корневая система, а в культурах с открытой корневой системой – стержневая. Это снижает устойчивость лесных культур с закрытой корневой системой к часто повторяющимся засухам и повышенному ветровому режиму, которые свойственны данному району.

УДК 630*232.411.4

С.В. Левин

Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии (Воронеж, Россия)

К вопросу о развитии лесосеменных плантаций кедра сибирского вегетативного типа создания в Республике Алтай

Сибирский кедр – порода светолюбивая, долговечная, холодостойкая, в сильной степени микотрофная, относительно быстро растущая в соответствующих условиях, способная давать урожаи семян до глубокой старости. Несмотря на эти свойства, определенные условия ограничивают ее применение за пределами естественного ареала и не только. Рассматриваются проблемы, связанные с развитием высокопродуктивных лесосеменных плантаций вегетативного способа создания (ЛСП) и архивов клонов, включающих потомства лучших генотипов на территории Республики Алтай. Созданные высокопродуктивные лесосеменные плантации с возраста более 25 лет подверглись влиянию фитопатогена диплодиоза *Sphaeropsis sapinea*, занесенного сосновой стволовой огнёвкой (*Dioryctria sylvestrella* Ratz.) и чёрной журчалкой (*Cheilosia morio* Ztt.). В результате обобщения исследований можно считать причинами массового поражения ЛСП: различные ход роста и развитие деревьев в связи с внутрипопуляционной изменчивостью; условия местопроизрастания и размещение объектов; влияние совместимости и качества прививки; показатели

используемых черенков; значительный возраст прививочного материала. Причины этого явления нуждаются в тщательном анализе, так как происходящее может ограничить метод сохранения генетического потенциала ценных популяций кедра путем прививки в пределах его естественного ареала. В связи с предполагаемым ограниченным сроком службы ЛСП и архивов клонов вегетативного происхождения рекомендуется на единице площади одновременно с упомянутыми выше объектами при их создании использовать семенной материал плюсовых деревьев с последующей посадкой саженцев из него, размещая их группами.

Ключевые слова: сосна кедровая сибирская, клоны, лесосеменные плантации, прививки и их совместимость, возраст плюсового дерева, фитопатоген диплоидоза *Sphaeropsis sapinea*, стволовая огнёвка (*Dioryctria sylvestrella* Ratz.), чёрная журчалка (*Cheilosia morio* Ztt.).

Введение. Сосна кедровая сибирская, кедр сибирский (*Pinus sibirica* du Tour.) является ценной орехоплодной лесообразующей породой России. Благодаря сильно выраженной средообразующей способности кедра, мощности его корневой системы и размещению кедровников в горах, весьма велико водоохранное, противозероизонное и климаторегулирующее значение кедровых лесов. Простые расчеты показывают, что иные свойства кедровников имеют для общества намного большее значение, чем их сырьевые ресурсы (Дроздов, 1998; Земляной, 2015).

Материалы и методы исследований. Сохранение генетического потенциала ценных популяций кедра возможно путем создания высокопродуктивных лесосеменных плантаций (ЛСП), включающих потомство лучших генотипов, ориентированных на повышенную семенную продуктивность (урожайные), интенсивность роста и формирование фитомассы (экологические) (Царев, 2014). Работы по сохранению ценного генофонда кедра сибирского в Республике Алтай (Титов, 2004) ведутся с 1980-х гг. XX в., с момента создания плантаций на территории Пыжинского участкового лесничества Турочакского лесничества (территория современной Республики Алтай) в квартале 10 (51°52'400 с. ш., 87°06'350 в. д.) (см. рис. 1). По со-

стоянию на 2014 г. в Турочакском лесничестве Республики Алтай наличие объектов постоянной лесосеменной базы характеризуется следующими показателями: лесосеменных плантаций (ЛСП) – 52,3 га; архивов клонов – 12,3 га; плюсовых насаждений – 51 га; плюсовых деревьев – 220 шт. (Лесохозяйственный регламент Турочакского лесничества, 2014).



Рис. 1. Лесосеменные плантации кедра сибирского, созданные в черном поясе Северо-Восточного Алтая (490 м над у. м.) по годам создания: слева – 1980 г. с проявлением влияния фитопатогена *Sphaeropsis sarinea* на равнине; справа (на заднем плане) – 1987 г., на склоне.
Фото автора

Разнородность клонов по селекционным признакам уже сейчас создает перспективу селекции по выделению сортов-клонов как по отдельным признакам, так и по выявленной их взаимосвязи (рис. 2).



Рис. 2. Выраженный полиморфизм: слева – на переднем плане деревья с преобладанием в кроне побегов мужского типа, на заднем плане

и справа – дерево-лидер с побегами переходного типа. Фото автора

В связи с важностью данных объектов большое значение имеет оценка их сохранности и состояния. К сожалению, динамика сохранности отрицательная из-за воздействия природных и антропогенных факторов. В процессе визуального обследования ЛСП в 2007 г. было обнаружено покраснение хвои на отдельных ветвях кроны у отдельных деревьев (см. рис. 3). В августе 2013 г. инженерами-лесопатологами ФБУ «Рослесозащита» осматривались деревья на ЛСП посадки 1980 г. и клоновые архивы посадок 1986, 1990 и 1997 гг. Отмечено активное засмоление стволов деревьев (около 90% деревьев) различного диаметра – от 8 до 28 см, на высоте от 0 до 3 м, чаще всего под мутовками и на месте прививок, вызванное обрубкой сучьев и повреждениями различных видов стволовых вредителей: сосновой стволовой огнёвкой (*Dioryctria sylvestrella* Ratz.) и чёрной журчалкой (*Cheilosia morio* Ztt.) (данные Российского центра защиты леса).



Рис. 3. Степень повреждения плантации деревьев кедра с побегами мужского типа фитопатогеном *Sphaeropsis sapinea* в 2007 г. (а) (фото А. И. Ирошниковой); то же дерево в 2017 г. (б); общий вид (в) (фото С.В. Левина)

Во время проведения обследования ЛСП (август 2017 г.) с целью установления величины пыльцевой продуктивности и сбора образцов хвои для генетического анализа сотрудниками ВНИИЛГИСбиотеха Е.В. Титовым и С.В. Левиным было выявлено значительное усыхание хвои в нижней части кроны деревьев исключительно побегов мужского

типа (рис. 3). Образцы растительного материала пораженной хвои кедра сибирского (*Pinus sibirica du Tour.*), собранных на участках ЛСП 1980 и 1981 гг. и сосны обыкновенной (*Pinus silvestris*) – за ее пределами, были переданы в филиал ФБУ «Рослесзащита» – ЦЗЛ Воронежской области». Специалистами отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов Е.А. Воробьевой, Е.Е. Кулаковым, Н.А. Карпеченко был проведен молекулярно-генетический анализ образцов. В результате обнаружен фитопатоген *Cladosporium sp.* в образце (*Pinus silvestris*) и диплوديоза *Sphaeropsis sapinea* в образце (*Pinus sibirica du Tour.*)

Результаты и их обсуждения. Поражения фитопатогеном именно побегов мужского типа можно объяснить разной активностью мужских и женских побегов плодоносящей части кроны. У кедра сибирского женский и мужской побег обязательно разделены ростовыми. Постепенный переход от женской сексуализации к мужской возможен, особенно на ветвях 2-го порядка, обратный переход от мужской сексуализации к женской совершенно исключается. Женская сексуализация характерна преимущественно для ветвей младших порядков ветвления и меньшего собственного возраста, мужская, наоборот, ветвей старших порядков и большего собственного возраста. При этом длина побегов всех типов убывает в направлении от низших порядков к высшим, а в пределах одноименных порядков наибольшей ростовой активностью отличаются побеги с женскими шишками. Высокая активность женских побегов объясняется наличием на них активных потребляющих центров – вначале зачаточных, а после цветения – молодых шишек. Какого-либо ослабления женского побега после цветения не может быть, так как на нем остается растущая молодая шишечка, в терминальной почке закладываются зачатки новых шишек, а на следующий год на нем же будет расти двухлетняя шишка с семенами (Некрасова, 1961).

Массовое поражение ЛСП может быть связано со следующими причинами:

1. Различные ход роста и развития деревьев в связи с внутрипопуляционной изменчивостью; от вертикальной зональности, условий местопроизрастания и размещения объектов (уклон местности, высота над уровнем моря, подготовка участка, густота посадки) (см. рис. 1, 2);
2. Влияние совместимости и качества прививки, показатели используемых черенков;

3. Значительный возраст прививочного материала.

Результаты внутрипопуляционной изменчивости как одну из причин легко наблюдать в проявлении высокого полиморфизма кедра сибирского на ЛСП (рис. 2). Так, на ЛСП, созданной в 1981 г., полиморфизм кедр в возрасте 43 лет виден на основе разницы полученных данных (2017 г.) – таксационных показателей каждого пятого обмеренного дерева со смежных рядов (рис. 4).

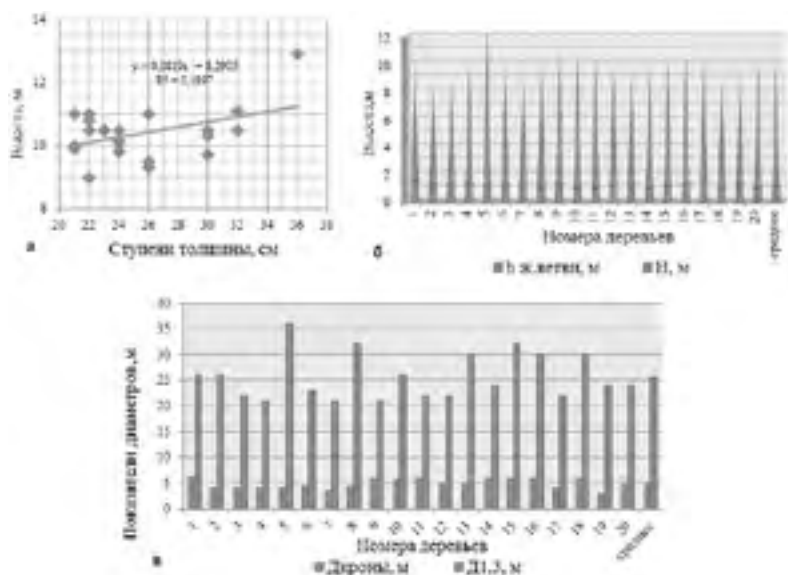


Рис. 4. График соотношения диаметров и высот (а); диаграммы высот (б) и диаметров (в)

Наиболее сильны различия по диаметру на высоте груди измеряющего (20–36 см) и диаметру кроны (3–6,3 м). Учитывая свободное размещение на территории деревьев (8 x 8 м), высота прикрепления живой ветви в среднем составила 1,17 м в пределах 1–1,5 м. С размещением связана и высота деревьев, которая составляла от 8,1 до 11,7 м при средней величине 9,23 м.

Учитывая различный ход роста и состояние деревьев, можно попытаться обосновать неизбежное поражение ЛСП фито- и энтомо-вредителями как результат взаимосвязи всех трех вышеупомяну-

тых групп причин. Явление поражения деревьев можно представить в следующей последовательности. Процессы, приводящие к нарушению целостности дерева в результате прививки, выводят из состояния равновесия корни и крону, вызывая в их взаимодействии смещение в сторону ослабления корневой деятельности, что предполагает изменения защитной реакции дерева. Чтобы преодолеть сопротивление защитной реакции деревьев, насекомые выработали способность отыскивать подходящие по физиологическому состоянию деревья, нападать на них роями и концентрироваться с определенной плотностью поселения. Контактируя на поврежденных деревьях с некоторыми микроорганизмами, насекомые создают симбиоз с ними и разносят заболевания. Взаимоотношения стволовых вредителей с грибами и другими микроорганизмами очень сложны и разнообразны (Маслов, 1973). Стволовые вредители концентрируются в ослабленном растении, собираясь из окружающих насаждений, а по мере отработки деревьев в очаге начинается миграция насекомых в обратном направлении. В рассматриваемой ситуации наблюдается стволовой тип ослабления и отмирания, так как нарушение защитной реакции произошло ниже средней части ствола в результате его поражения (место прививки) под влиянием фитопатогена диплоидоза *Sphaeropsis sapinea*, занесенного сосновой стволовой огнёвкой (*Dioryctria sylvestrella* Ratz.) и чёрной журчалкой (*Cheilosia morio* Ztt.).

Косвенно подтверждают вышеупомянутые причины массового поражения плантации фито- и энтомовредителями результаты исследований, проведенных в 1990–1993 гг. сотрудником ЦНИИЛГИС Е.В. Титовым (Отчет о НИР по теме IV.2.9, Ирошников, 1993; Отчет о НИР по теме IV.2.9, Ирошников, 1992; Отчет о НИР по теме II.2.2, Храмов, 1990).

Учитывая, что и ЛСП, и архивы клонов создавались методом прививок на кедровом подвое, следует рассмотреть результаты их развития, связанные как с самим подвоем, так и применяемым привоем с плюсовых деревьев.

Е.В. Титовым отмечено, что дифференциация клонов по энергии роста в высоту зависит как от индивидуальных особенностей, так и от местопроизрастания маточных деревьев и района их клонирования. Так, на примере расположения ЛСП в среднегорье (1000–1100 м

над у.м.) у большинства привоев в шестилетнем возрасте из нижней части горно-таежного подпояса (800–900 м над у.м.) текущий прирост в высоту составлял 31–37 см. Общая высота быстрорастущих клонов (130–139 см) превышает аналогичный показатель медленнорастущих (84–92 см) в среднем на 52%. У пятилетних привоев из средней части среднегорья (1300 м над у.м.) быстрорастущие клоны имеют текущий годичный прирост 26–32 см и общую высоту 55–66 см, медленнорастущие – 18–20 и 32–42 см соответственно. Превышение составляет в среднем 60–70%. При этом по степени сохранности прививок обособились три группы: высокосовместимые (95–100% привоев), с повышенной (80–90%) и пониженной (55–75%) совместимостью. Первая группа клонов имеет высокие показатели на обоих видах подвоя (лесные культуры и подрост), независимо от высоты места прививки черенков, в то время как совместимость остальных зависит именно от нее. При значительных различиях в высоте места прививки на подвое (на 30–40%), характерных для шестилетних прививок, отмечается тенденция к лучшей совместимости на низких лесных культурах (высотой 140–170 см), нежели на высоком подросте (200–240 см). При меньших различиях (до 25%) на пятилетней плантации в большинстве случаев высота места прививки (150–190 см) не оказывает влияния на сохранность привоев на разных подвоях (Отчет о НИР по теме IV.2.9, Ирошников, 1993).

Относительно привоя прежде всего следует остановиться на показателях как самого материала, так и показателях, характеризующих плюсовое дерево. Руководствуясь положениями разработанной на тот момент методики (Ирошников, Титов, 1990), параметры показателей используемых черенков в их связи с характеристикой самого дерева оказались следующими: средний диаметр черенков колеблется от 70 до 96 мм; средний прирост за последний год – от 3,4 до 5,6 см; процент побегов с «озимью» – от 24 до 100%; средний процент ежегодно плодоносящих побегов от 35 до 97%; средняя энергия плодоношения от 0,58 до 2,09 (Отчет о НИР по теме IV.2.9, Ирошников, 1993).

Наиболее значительно различаются клонируемые деревья по энергии плодоношения ($c = 32\%$), числу побегов с «озимью» ($c = 28,5\%$) и среднему числу ежегодно плодоносящих побегов ($c = 24,3\%$). По линейным размерам привой варьирует меньше: по среднему при-

росту за последний год – 16,3%; по среднему диаметру – 12,1% (Отчет о НИР по теме IV.2.9, Ирошников, 1993). Показатели роста и плодоношения черенков у клонируемых деревьев отражают особенности местопроизрастания маточников на высотном профиле (табл.), с которыми связаны наблюдаемые различия корреляции у прививаемых черенков между показателями роста и плодоношения.

У черенков по-разному выявлена корреляция с учетом местопроизрастания маточных деревьев. Так, между приростом побегов за последний год установлена обратная высокая корреляция с энергией плодоношения (400 м над у.м.) и процентами побегов с озимью (700–900 м над у.м.) и диаметром (400 м над у.м.). Между диаметром черенков и процентами плодоносящих побегов наблюдалась корреляция 0,68 на стыке высотных подпоясов (700–800 м над у.м.). Наиболее тесная связь отмечается у кедров при коэффициенте корреляции 0,51–0,7 между среднеголетним количеством ежегодно плодоносящих побегов и их числом с озимью текущего года на всем высотном профиле и энергией плодоношения на стыке высотных подпоясов. При этом отмечено, что особи с более высоким процентом ежегодно плодоносящих побегов образуют годичные побеги меньшей длины (3,5–4,5 см), но большего диаметра (80–90 мм) (Отчет о НИР по теме IV.2.9, Ирошников, 1992). Полученные данные подчеркивают высокую индивидуальную изменчивость генотипов по селективируемым признакам.

Основная роль в формировании кроны привитого кедра также должна быть отведена возрасту плюсовых деревьев, с которых брались черенки для привоев. Наиболее объективно подошел к решению вопроса о возрасте кедровников при отборе лучших маточных древостоев для организации в них семеноводства А.С. Яблоков, рекомендуя его не ниже 60–80 лет и не выше 120–60 лет (Яблоков, 1962). Но уже в последующем это мнение о возрасте изменилось, так как «благодаря длительной способности кедра к репродуктивной деятельности, для отбора пригодны деревья в возрасте 120 – 250, иногда до 300 лет, сохраняющие также и достаточно хороший рост, что дает возможность использовать побеги на черенки» (Земляной, 1980).

Корреляции прививаемых черенков между показателями
роста и плодоношения

Корреляционные признаки	Местопроизрастание маточных деревьев (высота над уровнем моря, м)		
	400	700–800	850–900
Прирост за последний год			
• процент ежегодно плодоносящих побегов	-0,07	-0,34	-0,49
• процент побегов с озимью	-0,34	-0,58	-0,54
• энергия плодоношения	-0,62	0,21	-0,27
Диаметр			
• процент ежегодно плодоносящих побегов	0,29	0,68	0,39
• процент побегов с озимью	-0,30	0,12	0,49
• энергия плодоношения	-0,28	0,42	0,27
Прирост за последний год			
• диаметр	0,62	0,06	-0,32
Энергия плодоношения			
• процент ежегодно плодоносящих побегов	0,23	0,62	0,08
• процент побегов с озимью	-0,26	0,58	-0,43
Процент ежегодно плодоносящих побегов			
• процент побегов с озимью	0,51	0,70	0,62

Учитывая значительный возраст привитого материала, мы наблюдаем значительное превышение деревьев мужского и смешанного типов над деревьями женского типа в соотношении 5:4:3. При этом на ЛСП наблюдаются деревья, схожие в строении кроны и процессе усыхания ветвей с деревьями 180-летнего кедровника (рис. 5).

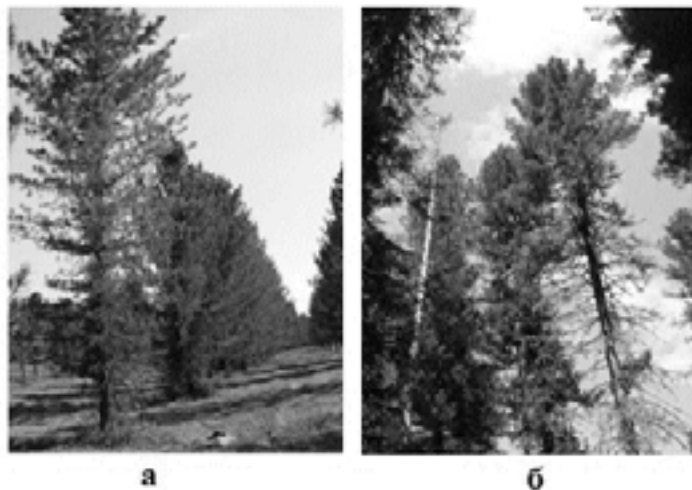


Рис. 5. Проявление форм деревьев: слева – на 36-летней плантации; справа – в 180-летнем кедровнике (400 м над у.м.) на территории Пыжинского участкового лесничества Турочакского лесничества Республики Алтай

Ограниченность использования материала возрастом более 160–180 лет в качестве плюсовых можно видеть на примере 30 деревьев, отобранных при их произрастании в урочище Карайдо (рис. 6) (Отчет о НИР по теме II.2.2, Храмов, 1990). На рисунке 6 видно, что связь возраста с таксационными показателями: диаметром и объемом ствола – описывается уравнением линейной зависимости с высокой степенью аппроксимации в отличие от его связи с высотой по причине прекращения роста в высоту. При этом по построению кривых полиномиальных уравнений с невысоким уровнем аппроксимации можно говорить об отсутствии значительных изменений показателей плодоношения в связи с возрастом деревьев: протяженности плодоносящего яруса (в среднем 7,59 м), числа плодоносящих побегов (в среднем 241 шт.), средней урожайности (в среднем 2,64 кг). Выделяются по показателям: числу плодоносящих побегов и средней урожайности – лишь два плюсовых дерева в возрасте 250 лет, но их количество ограничено по причине отсутствия таковых в древостоях.

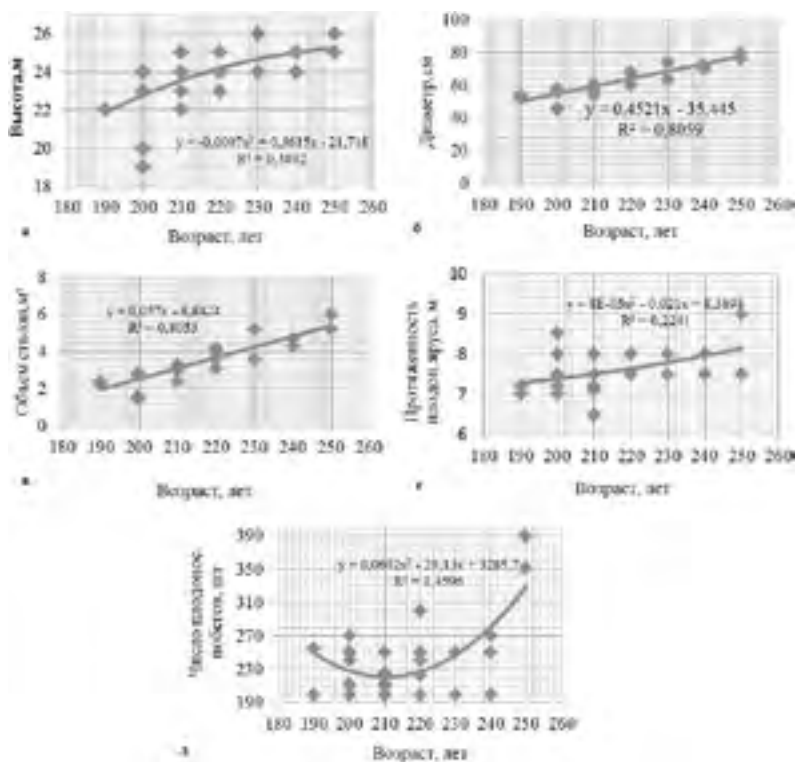


Рис. 6. Графики соотношения возраста плюсовых деревьев с их показателями: таксационными: высота (а), диаметр (б), объем ствола (в); плодоношения: протяженность плодоносящего яруса (г), число плодоносящих побегов (д)

Выводы. Учитывая вышеизложенное, можно сделать следующее заключение:

- 1) созданные высокопродуктивные лесосеменные плантации (ЛСП), включающие потомство лучших генотипов на территории Республики Алтай, с возраста более 25 лет подверглись влиянию фитопатогена диплодииа *Sphaeropsis sapinea*, занесенного сосновой стволовой огнёвкой (*Dioryctria sylvestrella* Ratz.) и чёрной журчалкой (*Cheilosia morio* Ztt.);

- 2) приостановить процессы распада объектов можно лишь эффективными мерами борьбы с вышеупомянутыми вредителями и болезнями;
- 3) необходимо провести научные исследования с целью обоснования влияния на развитие дерева предполагаемых причин распада культур в различных местах высотного профиля в сравнении с состоянием как лесных культур, так и подроста древостоев;
- 4) при закладке объектов (ЛСП, архивов клонов) применять черенки с плюсовых деревьев в возрасте до 120 лет;
- 5) в связи с выявленным ограниченным сроком службы ЛСП и архивов клонов вегетативного происхождения на единице площади одновременно с вышеупомянутыми объектами при их создании использовать семенной материал плюсовых деревьев с последующей посадкой саженцев из него, размещая их группами;
- 6) учитывать при закладке объектов следующие требования: уклон местности – 10°; наличие почвы с лесным плодородием; высота над уровнем моря – 600–700 м.

Библиографический список

Drozдов I.I. Coniferous introduced tree species in forest cultures. Moscow, 1998.

Forestry regulations of Turochak forestry of the Ministry of natural resources, ecology and property relations of the Republic of Altai [Electronic resource]. URL: http://altai-republic.ru/documents/reglament_torochak.pdf

FSI «Russian center of forest protection» [Electronic resource]. URL: http://www.rcfh.ru/28_02_2014_d3838.html

Hramov A.A. Carry out selection in the nature and removal of valuable forms and grades of forest tree breeds for receiving non-wood production the report on research on a subject II.2.2. NIILGIS. Voronezh, 1990.

Iroshnikov A.I. To develop methods of selection, introduction and increase of seed yield of Siberian cedar (intermediate). Research report on topic IV.2.9. NIILGIS. Voronezh, 1993.

Iroshnikov A.I. To develop methods of selection, introduction and increase of seed yield of Siberian cedar. Research report on topic IV.2.9. NIILGIS, Voronezh, 1992.

- Iroshnikov A.I., Titov E.V. Recommendations for the selection and evaluation of plus trees of Siberian cedar for seed production. Voronezh, 1990.
- Maslov A.D. Stem pests of forest. M.: Publishing house "Forest industry", 1973.
- Nekrasova T.P. Cedar Fruiting in Western Siberia. Novosibirsk, 1961.
- Titov E.V. Plantation forest cultivation of cedar pines. Voronezh, 2004.
- Tsarev A.P., Pogiba S.P., Laur N.V. Breeding of forest and ornamental woody plants. Moscow, 2014.
- Yablokov A.S. Selection of the fallopian plants and trees pine pine trees in the forests of Siberia and the far Eastern region. Moscow, 1962.
- Zemlyanoj A.I. About the program of selection of Siberian cedar (*Pinus sibirica du Tour.*) on seed production: 4th International meeting on conservation of forest genetic resources in Siberia, Barnaul, 2015.
- Zemlyanoy A.I., Nekrasova T.P. Methods of selection of plus trees of Siberian cedar on seed productivity. Moscow, 1980.

УДК 630*243 (571.15)

А.А. Маленко, В.А. Елизаров

Алтайский государственный аграрный университет (Барнаул, Россия)

Влияние двухприёмных изреживаний на сортиментную структуру высокопродуктивных культур сосны в сухой степи

Исследование подтверждает сделанные ранее выводы о снижении рубками ухода доли дровяных стволов и улучшении сортиментной структуры древостоев. В условиях сухой степи равномерные двухприёмные рубки – от слабой до очень сильной интенсивности – полностью или до минимума сократили количество деревьев с дровяными стволами. Товарная структура изреженных 55-летних

высокопродуктивных культур сосны на 80–82% представлена деловой древесиной, из которой на долю мелкотоварных сортиментов приходится от 47 до 61%, при 77% на контроле. На изреженных площадях доля деловых сортиментов средних размеров составила 39–52%, а на контроле – 22%. В целом на контрольном варианте товарная структура оказалась хуже, чем на вариантах с изреживанием, что подтверждается значениями показателя коэффициента качества.

Ключевые слова: сухая степь, лесные культуры, сосна, рубки ухода, товарная структура древостоев, показатель качества.

Введение. Известно, что рубки ухода способствуют улучшению качества насаждений. Это положительное свойство рубок ухода заключается в том, что при изреживаниях в первую очередь удаляются худшие по качеству деревья, обладающие пороками ствола, ведущими к снижению процента выхода деловой древесины.

По данным П.П. Изюмского (1978), общий выход деловой древесины повышается с увеличением возраста насаждений: без коры в сосновых древостоях на 85% от общего количества вырубленной стволовой древесины с корой. Вместе с увеличением выхода деловой древесины в ней улучшается и сортиментный состав.

Ближние данные о выходе деловых сортиментов получены при рубках ухода в лесах Белоруссии (Лосицкий, 1939). Здесь удельный вес деловой части в заготавливаемой при уходе за лесом продукции для сосновых древостоев в 30-летнем возрасте и старше составлял 72–92,6%, а по данным П.П. Изюмского, 36–72%.

Располагая данными по формированию сортиментной структуры древостоев под воздействием рубок ухода в сухих условиях произрастания, мы сравнили их с аналогичными данными, полученными в других регионах.

Объекты и методы исследований. Исследования проведены в юго-западной части ленточных боров Западной Сибири, в лесорастительных условиях свежего бора. Рельеф ровный, слабовсхолмленный, почва дерново-степная среднемощная связнопесчаная. Климатические условия сухой степи характеризуются сравнительно небольшим количеством осадков (210–230 мм в год), снижением от-

носительной влажности воздуха в вегетационный период до 30%, суховейными ветрами и частыми засушливыми годами.

Объектом исследований служили 55-летние культуры сосны полосного типа, пройденные в возрасте 18 и 28 лет двумя приемами рубок ухода. Постоянная пробная площадь (ППП) заложена, последующие стационарные наблюдения на ней проведены в соответствии с методическими указаниями Н.Н. Георгиевского (1953) и ОСТ 56-69-83. На рабочих секциях в зависимости от интенсивности и принципа назначения деревьев в рубку проведены равномерные (селективные) изреживания различной интенсивностью по следующим схемам:

- 1) секция А – контроль, без изреживания;
- 2) секция Б – равномерное (селективное) изреживание; предполагает индивидуальный отбор деревьев, оставляемых на дорастивание при равномерном их размещении по площади и создания для них благоприятных условий почвенного и светового питания;
- 3) секция Б1 – равномерная рубка слабой интенсивности (до 15% по запасу); аналогично ей Б2 – 25%, Б3 – 35%, Б4 – 45% по запасу.

После каждого изреживания в древостоях с периодичностью 5 и 10 лет проводились повторные измерения. Определение лесоводно-таксационных показателей на секциях проводили общепринятыми в лесном хозяйстве методами. При расчете запасов древесины использовали сортиментные таблицы для сосны древостоев ленточных боров (1987).

Результаты исследований. Исследование лесных культур показало на имеющиеся незначительные различия в таксационных показателях до проведения рубок (см. табл. 1), а также существенных изменений под воздействием первого и второго изреживания разной интенсивности исследуемых древостоев.

В большей мере снизилась густота древостоев на вариантах рубок. В периоды между приемами рубок, а также после повторного изреживания и последним сроком наблюдения (55 лет) произошло восстановление таксационных показателей. Однако по причине сухости климата эти изменения оказались не столь существенными. Наиболее значительные изменения произошли с запасами древесины. Наибольшие их значения отмечены на вариантах равномерной рубки сильной (Б3) и очень сильной (Б4) интенсивности, а наимень-

шие – на площадях после слабых и умеренных рубках (варианты Б1 и Б2). При этом запасы древесины на контроле превысили значение таковых на вариантах Б1 и Б2.

В целом, на всех вариантах рубок в 55-летнем возрасте сформировались сравнительно тонкомерные стволы с минимальным средним диаметром на контроле (13,0 см).

Таблица 1

Таксационная характеристика лесных культур сосны
в различные периоды их роста

Секции	Густота, шт./га	Вырублено, %		Средние		Класс бонитета	Полнога	Сумма пл. сечения, м2/га	Запас, м3/га
		по запасу	по числу стволов	диаметр, см	высота, см				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Дорубки в возрасте 18 лет									
A	4508	0	0	7,5	7,0	I	0,85	19,7	79
Б1	4137	15,4	39,9	7,9	6,8	I	0,85	19,6	77
Б2	4874	25,0	51,3	7,4	7,2	I	0,9	21,0	88
Б3	4507	35,9	63,3	7,9	7,0	I	0,95	22,3	92
Б4	4941	42,8	69,0	7,8	6,9	I	0,95	21,4	85
Спустя 27 лет после повторной рубки (55 лет)									
A	2538	0*	0*	13,0	17,2	I	0,95	33,8	285
Б1	1176	33,5*	75,1*	17,9	19,5	Ia	0,77	29,3	263
Б2	1300	45,6*	84,1*	16,3	19,1	Ia	0,72	27,1	242
Б3	1220	45,8*	80,5*	19,0	20,0	Ia	0,9	34,7	312
Б4	1246	49,3*	86,4*	18,9	19,9	I	0,9	34,8	315

Примечание: * приведен суммарный процент рубки за два приема.

В таблице 2 представлена сортиментная структура 55-летних искусственных сосняков, пройденных двумя приемами рубок ухода.

Таблица 2

Сортиментная структура искусственных сосняков,
пройденных двумя приемами рубок ухода

Варианты	Кол-во деревьев			Деловая древесина				Дрова от деловой	Отходы	Дровяные стволы	Общее	Коэффициент качества
	деловые	дровяные	всего	крупная, 25 см и >	средняя, 14-24 см	мелкая, до 10 см	всего					
А	1998	540	2538	-	45,0	154,0	199,0	8,4	38,7	24,9	271,0	1,53
Б1	1176	-	1176	1,2	101,5	116,9	219,6	10,6	38,2	-	268,4	1,93
Б2	1262	38	1300	-	75,6	119,3	194,9	8,8	34,6	3,7	242,0	1,80
Б3	1209	11	1220	0,3	137,7	124,3	262,3	10,9	44,8	1,5	319,5	2,00
Б4	1246	-	1246	0,9	136,3	122,7	259,9	12,3	44,8	-	317,0	2,00

Из приведенных данных видно, что равномерные двухприемные рубки слабой и очень сильной интенсивности (варианты Б1 и Б4) полностью, а умеренные и сильные рубки (варианты Б2 и Б3) до минимума сократили количество деревьев с дровяными стволами в сравнении с контролем. Товарная структура изреженных древостоев представлена на 80–82 % деловой древесиной при минимальном количестве на контроле (73) %, из которой по крупности на долю мелкотоварных сортиментов приходится на контроле – 77 и от 47 до 61% на изреженных площадях. При этом на участках с изреживанием доля деловых сортиментов средних размеров составила от 39 до 52 %, а на контроле – только 22%. В изреженных древостоях в доле деловых сортиментов преобладает подтоварник – 41–45% и стройлес – 24–29%, при минимальном количестве жердей – 4–7%. На контрольном варианте товарная структура значительно хуже, чем на вариантах с изреживанием. Положительное влияние изреживаний на сортиментную структуру древостоев сосны подтверждается показателем – коэффициентом качества.

Выводы. Проведенные исследования подтверждают ранее сделанные выводы о снижении рубками ухода доли дровяных стволов. В ус-

ловиях свежего бора в сухой степи сортиментная структура 55-летних культур сосны, пройденных двумя приемами рубок ухода, представлена на 80–82% деловой древесиной, из которой на долю мелкотоварных сортиментов приходится 47–61%. В доле деловых сортиментов в изреженных древостоях преобладает подтоварник – 41–45% и стройлес – 24–29%. В древостоях без уходов (контроль) сортиментная и товарная структура значительно хуже, чем на вариантах с изреживанием.

Библиографический список

Георгиевский Н.П. Методика опытных работ по рубкам ухода за лесом // Труды института лесохозяйственных проблем. 1953. Т. V. С. 227–241.

Изюмский П.П. Выращивание высокопродуктивных лесных насаждений с применением новой технологии. М., 1978. 168 с.

Лосяцкий К.Б. Следует ли применять рубки ухода высокой интенсивности // Лесное хозяйство. 1939. №11. С. 9–14.

ОСТ 56-69-83 Пробные площади лесоустроительные, метод закладки. – 59 с.

Сортиментные и товарные таблицы для лесов Казахстана. Алма-Ата, 1987. 228 с.

УДК 630*221.2:630*231(571.150)

А.А. Малиновских, А.А. Маленко, А.С. Чичкарев

Алтайский государственный аграрный университет (Барнаул, Россия)

Естественное возобновление сосны обыкновенной после выборочных и постепенных рубок в ленточных борах Алтайского края

Выполнены масштабные исследования лесосек прошлых лет после проведения выборочных и постепенных рубок в спелых и пе-

рестойных насаждениях в ленточных борах Алтайского края. На зонально-географической и лесотипологической основе изучены особенности естественного возобновления главной породы – сосны обыкновенной после рубок. Установлено, что количество и качество молодого поколения сосны зависит от вида рубки (выборочная или постепенная), типа леса, типа лесорастительных условий. Успешным следует признать естественное возобновление сосны после добровольно-выборочных и группово-выборочных рубок, когда сохраняется лесная обстановка (полог леса). Здесь наблюдается устойчивый рост и развитие предшествующего, сопутствующего и последующего возобновления сосны. Количество подроста сосны сильно варьирует по типам леса и находится в пределах 3–15 тыс. шт./га. Более 50 % всего количества подроста, расположенного в окнах и под пологом древостоя, после ГВР и ДВР относится к благонадежному, 25–40 % – к сомнительному, 10–15 % – к неблагонадежному. Наилучшего своего развития и качества подрост сосны достигает в куртинах, или биогруппах, где молодые растения взаимно подгоняют друг друга, затеняют почву от чрезмерного иссушения и препятствуют развитию живого напочвенного покрова (ЖНП). На участках леса после проведения чересполосной постепенной рубки происходит сильное разрастание живого напочвенного покрова, кустарников из состава подлеска, второстепенных и нежелательных пород. Подроста сосны предварительной генерации мало, процесс последующего возобновления сильно замедляется, а на большинстве вырубленных полос прерывается. На отдельных вырубленных полосах наблюдается смена пород: сосны на березу и осину. Лесные культуры сосны, созданные после рубки, имеют слабую приживаемость и в дальнейшем «уходят» в отпад по причине угнетения со стороны травянистой растительности. Немногим лучше результаты у метода содействия естественному возобновлению леса, выполненного площадками шириной 2 м и длиной от 10 до 40 м. На площадках появляются всходы и самосев сосны, но происходит их угнетение травянистой и кустарниковой растительностью. Чересполосные постепенные рубки в условиях ленточных боров Алтайского края не обеспечивают необходимого лесоводственного эффекта при естественном и искусственном возобновлении сосны. Их необходимо исключить из применяемой системы рубок и заменить на выборочные.

Ключевые слова: ленточные боры, возобновление леса, сосна обыкновенная, подрост, добровольно-выборочная рубка, группово-выборочная рубка, чересполосная постепенная рубка, успешность возобновления, тип леса.

Введение. До недавнего времени лес рассматривался человеком в основном в качестве источника сырья. В современных условиях в мире происходит переоценка взглядов на значение леса и признание за ним ведущей роли среди компонентов биосферы, что предопределяет необходимость совершенствования системы ведения лесного хозяйства и переориентацию ее в направлении повышения экологической значимости лесов (Куваев и др., 2001). Особенно это важно для малолесных районов, к которым относятся Алтайский край и произрастающие на южной границе ареала сосны обыкновенной ленточные боры, представляющие собой местную популяцию этого вида.

Рубки главного пользования и лесовосстановительные рубки в классическом понимании, а с ведением в действие Лесного кодекса 2006 г. рубки в спелых и перестойных лесных насаждениях (Ткаченко, 1952; Погребняк, 1968; Мелехов, 2007) являются одним из эффективных путей решения задачи по ведению лесного хозяйства на принципах непрерывного и рационального лесопользования, улучшения качественного состава лесов.

Наряду с рациональным использованием запасов спелой древесины, важнейшими особенностями проводимых лесосечных работ является создание условий среды для ускорения процессов лесовозобновления и формирования древостоев, предотвращение эрозии почв, обеспечение лесом водоохранно-защитных, санитарно-гигиенических и других полезных функций.

В связи с изложенным актуальным остается вопрос, насколько проводимые в настоящее время в ленточных борах выборочные рубки спелых и перестойных лесных насаждений отвечают лесоводственным требованиям по обеспечению подростом вырубок прошлых лет.

Цель работы – изучить процесс естественного возобновления сосны обыкновенной после выборочных и постепенных рубок в спе-

лых и перестойных насаждениях в ленточных борах Алтайского края.

По заданию управления лесами Алтайского края нами в 2017–2018 гг. были обследованы лесосеки после проведения выборочных и постепенных рубок 6–9-летней давности (2009–2011 гг.) в спелых и перестойных сосновых насаждениях системы ленточных боров Алтайского края.

Объекты и методы исследований. Объекты исследований – лесосеки, были подобраны с учетом географических и лесотипологических особенностей ленточных боров, их зонирования, находятся в двух природных зонах и трех подзонах юга Западной Сибири:

1. Степная зона, сухостепная подзона – Большой Гатский бор (Степно-Михайловское лесничество). Преобладающие типы лесорастительных условий – А1 (сухие), А2 (свежие), преобладающие типы леса – сухой бор пологих всхолмлений (Сбп), свежий (западинный) бор (Свб). Насаждения разновозрастные (2–5 поколений, 45–135 лет), средняя высота – 23,2 м, средний диаметр – 27,3 см, средний класс бонитета II,2, средняя полнота 0,62 ед., средний запас на 1 га – 231 м³.
2. Степная зона, засушливо-степная подзона – средняя часть Барнаульской и Касмалинской боровых лент (Новичихинское лесничество). Преобладающие типы лесорастительных условий – А1 (сухие), А2, А3 (свежие), преобладающие типы леса – сухой бор пологих всхолмлений (Сбп), свежий (западинный) бор (Свб), травяной бор (Трб). Насаждения разновозрастные (1–4 поколения, 40–130 лет), средняя высота – 23,8 м, средний диаметр – 30,0 см, средний класс бонитета II,6, средняя полнота – 0,60 ед., средний запас на 1 га – 230 м³.
3. Лесостепная зона, южно-лесостепная подзона – Кулундинская боровая лента (Кулундинское лесничество), северо-восточная часть Барнаульской и Касмалинской боровых лент (Ребрихинское лесничество). Преобладающие типы лесорастительных условий – А2, А3 (свежие), преобладающие типы леса – свежий (западинный) бор (Свб), травяной бор (Трб). Насаждения разновозрастные (1–4 поколения, 35–160 лет), средняя высота – 26,0 м, средний диаметр – 28,6 см, средний класс бонитета II,1, средняя полнота – 0,65 ед., средний запас на 1 га – 272 м³.

Для изучения естественного возобновления после рубок использовался метод рекогносцировочного обследования, непосредственного наблюдения за ходом смен растительности, пробных площадей, учетных площадок, геоботанических описаний (Понятовская, 1964; Методы..., 2002). Всего было обследовано более 50 лесосек, заложены 44 временные пробные площади, выполнено более 200 полных геоботанических описаний, заложено более 10 тысяч учетных площадок.

Результаты и их обсуждение. Анализ процессов естественного возобновления леса можно проводить по нескольким направлениям, рассматривая распределение подроста по группам качества, группам высот, группам возраста и др. Наибольшее значение после пожаров и рубок приобретает анализ качественной структуры молодого поколения леса, которая отражает одновременно интенсивность и успешность лесовозобновительного процесса. Выборочно приводим распределение подроста сосны по группам качества после выборочных рубок в ленточных борах (см. табл. 1).

Проведение выборочных рубок в ленточных борах соответствует природе соснового леса. Молодое поколение получает достаточное количество света, но в то же время не угнетается травянистой и кустарниковой растительностью, так как сохраняется лесная среда – полог леса. На это указывают значения густоты (шт./га) всходов и подроста по группам качества после выборочных рубок. Количество жизнеспособного подроста в 2–9 раз превышает минимальный порог (1,5–2,0 шт./га), согласно Правилам лесовосстановления (2016). Общее количество всходов и подроста сосны увеличивается в ряду сухие-свежие типы леса и зависит от зонального расположения (Малиновских и др., 2017, 2018).

Значительный научный интерес представляет возобновление сосны после чересполосных постепенных рубок (ЧПР), которые выполняют арендаторы лесного фонда в ленточных борах с 2009 г. Эти рубки назначают и проводят только в одном типе леса – травяном бору (ТРБ). Травяной бор, или, как более правильно с позиций классификации типов леса П.С. Погребняка (1968), влажный бор является самым производительным типом леса в ленточных борах. Однако возобновление леса в этом типе изначально протекает слабо и неравномерно из-за мощного развития подлеска и травянистого

покрова. Распределение подроста сосны по группам качества после чересполосных постепенных рубок в ленточных борах представлено в таблице 2.

Таблица 1

Количество подроста сосны обыкновенной по группам качества после выборочных рубок (ДВР, ГВР), шт./га

Пробная площадь	Вариант	всходы	Количество подроста, шт./га			Итого
			благ.	сомн.	неблаг.	
Сухая степь						
ПП 1, Ст.-Михайловское лесничество, кв. 21. в. 35, ГВР 2010 г., СБП	Окно	4950	9485	163	0	10885
	Полог	100	785	240	0	1075
ПП 5, Ст.-Михайловское лесничество, кв. 35. в. 16, ГВР 2010 г., СБП	Окно	0	3044	160	36	3240
	Полог	0	4470	800	100	5370
Засушливая степь						
ПП 12, Новичихинское лесничество, кв. 34, в. 7, ГВР 2011 г., ТРБ	Окно	1466	6730	636	200	9032
	Полог	435	4575	2240	1235	8485
ПП 20, Новичихинское лесничество, кв. 32, в. 4, ГВР 2011 г., СББ	Окно	353	3534	970	1333	6190
	Полог	3000	5370	320	500	9190
Южная лесостепь						
ПП 26, Кулундинское лесничество, кв. 62, в. 1, ДВР 2011 г., СББ	Участок 1	208	7430	4214	2530	14382
	Участок 2	1500	6470	1103	1310	10383
ПП 33, Кулундинское лесничество, кв. 69, в. 31, ГВР 2011 г., ТРБ	Окно	0	1672	850	693	3215
	Полог	0	7700	480	600	8780

Таблица 2

Количество подроста сосны обыкновенной по группам качества после чересполосных постепенных рубок (ЧПР), шт./га

Пробная площадь	Вариант	всходы	Количество подроста, шт./га			Итого
			благ.	сомн.	неблаг.	
Засушливая степь						
ПП 21, Новичихинское лесничество, кв. 37, в. 20, ЧПР 2016 г., ТРБ	Полоса	100	107	440	280	927
	Полог	220	1100	1440	3600	6360
Южная лесостепь						
ПП 32, Кулундинское лесничество, кв. 29, в. 8, ЧПР 2013 г., ТРБ	Полоса	0	40	80	60	180
	Полог	0	1000	350	1200	2550
ПП 34, Ребрихинское лесничество, кв. 36, в. 20, ЧПР 2009 г., ТРБ	Полоса	0	150	620	342	1112
	Полог	0	417	5083	1917	7417

После проведения чересполосной постепенной рубки происходит сильное разрастание живого напочвенного покрова, кустарников из состава подлеска, второстепенных и нежелательных пород (Малиновских, 2018). Подроста предварительной генерации мало, а процесс последующего возобновления сосны сильно замедляется, а на большинстве вырубленных полос прерывается. На отдельных вырубленных полосах (ЧПР 2009 г. в Ребрихинском лесничестве) наблюдается смена пород: сосны на березу и осину. Лесные культуры сосны, созданные после рубки, имеют слабую приживаемость и в дальнейшем «уходят» в отпад по причине угнетения со стороны травянистой растительности. Немногим лучшие результаты дает метод содействия естественному возобновлению (СЕВ) леса, выполненный площадками шириной 2 м и длиной от 10 до 40 м. На площадках появляются всходы и самосев сосны, но происходит их угнетение травянистой и кустарниковой растительностью. В травяном (влажном) бору необходимо проводить только рубки ухода и выборочные рубки с целью сохранения устойчивости насаждений и успешного лесовозобновления.

Выводы

Естественное возобновление сосны обыкновенной в ленточных борах после выборочных рубок (ГВР, ДВР) носит успешный и интенсивный характер во всех обследованных типах леса и природных зонах и подзонах.

Среднее количество подроста сосны обыкновенной на обследованных участках в пределах отдельных лесосек в 2–5–9 раз превышает минимальный порог согласно Правилам лесовосстановления в лесах РФ. В связи с этим основным способом лесовосстановления после выборочных рубок является естественное лесовосстановление путем мероприятий по сохранению подроста.

Возрастная структура подроста после выборочных рубок претерпевает «омолаживающий» эффект, т.е. происходит интенсификация лесовозобновительного процесса, за счет снижения полноты до оптимальной – 0,5–0,6 ед. на фоне сохранения лесной среды.

Более 50 % всего количества подроста, расположенного в окнах и под пологом древостоя после ГВР и ДВР относится к благонадежному, 25–40% – к сомнительному, 10–15 % – к неблагонадежному. Наилучшего развития и качества подрост сосны достигает в куртинах, или биогруппах, где молодые растения взаимно подгоняют друг друга, затеняют почву от чрезмерного иссушения и препятствуют развитию ЖНП.

Чересполосные постепенные рубки в условиях ленточных боров Алтайского края не обеспечивают необходимого лесоводственного эффекта в плане естественного и искусственного возобновления сосны. Их необходимо исключить из применяемой системы рубок и заменить на выборочные.

Авторы выражают благодарность работникам отделов обеспечения полномочий в области лесных отношений и предприятий-арендаторов лесного фонда Степно-Михайловского, Новичихинского, Кулундинского и Ребрихинского лесничеств за помощь в проведении полевых исследований.

Библиографический список

Куваев В.Б., Шахин Д.А., Роденков А.И., Телеснина В.М. Естественное восстановление сосновых лесов среднего Енисея после рубок (опыт долговременного комплексного мониторинга). М., 2001. 314 с.

Малиновских А.А. Влияние рубок в спелых и перестойных насаждениях на видовой состав живого напочвенного покрова в ленточных борах Алтайского края // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2018. №2. С. 80–86.

Малиновских А.А., Маленко А.А. Влияние живого напочвенного покрова на процесс естественного возобновления сосны обыкновенной после рубок в спелых и перестойных насаждениях в ленточных борах Алтайского края // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2017. №12. С. 58–64.

Малиновских А.А., Маленко А.А. Процесс естественного возобновления сосны обыкновенной после выборочных рубок в спелых и перестойных насаждениях в ленточных борах Алтайского края // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2018. №1. С. 67–72.

Мелехов И.С. Лесоводство. М., 2007. 324 с.

Методы изучения лесных сообществ. СПб., 2002. 240 с.

Погребняк П.С. Общее лесоводство. М., 1968. 440 с.

Понятовская А.А. Учет обилия и характера размещения растений в сообществах // Полевая геоботаника. М. ; Л., 1964. Т. 3. С. 209–285.

Правила лесовосстановления : приказ МПР России от 29. 06. 2016 г. № 375. 36 с.

Ткаченко М.Е. Общее лесоводство. М. ; Л., 1952. 600 с.

УДК 630*56

М.А. Савин, А.А. Маленко

*Алтайский государственный аграрный университет (Барнаул,
Россия)*

Формирование искусственных насаждений сосны обыкновенной, созданных под защитой ивы остролистной

Восстановление ленточных боров после пожаров сильно затруднено. Создание лесных культур сосны под защитой ивы остролистной в 60-летнем возрасте обеспечивает формирование средне- и высокополнотных искусственных насаждений I–IV классов бонитета с запасом 141 до 214 м³/га сырораствующей древесины. Результаты исследований могут быть использованы в лесохозяйственной практике Алтайского края при планировании лесовосстановительных мероприятий.

Ключевые слова: Сухая степь, сосна обыкновенная, ива остролистая, искусственные насаждения, формирование, продуктивность, ход роста.

Введение. С учетом высоких темпов развития лесной промышленности и экологической значимости лесов, успешное воспроизводство лесных ресурсов является стратегической задачей. Своевременное и качественное восстановление лесов невозможно без учета региональных особенностей и оценки имеющегося лесокультурного опыта.

В Алтайском крае жесткие лесорастительные условия создают серьезные трудности для восстановления лесов, особенно после крупных лесных пожаров (Савин и др., 2017). Поэтому выращивание устойчивых высокопродуктивных искусственных насаждений должно базироваться на знании закономерностей их роста, поскольку только направленное вмешательство человека в жизнь леса может обеспечить выращивание производительных древостоев.

В связи с большой ролью лесокультурных работ в стабилизации окружающей среды становится очевидно, что территория, освобожденная от леса в результате лесного пожара или рубки, должна быть восстановлена в кратчайшие сроки (Парамонов, 2008). Это становится особенно актуальным в экстремальных почвенно-климатических условиях, именно на таких участках создаются культуры в сухой степи. В таких условиях зарекомендовал себя способ посадки сосны под защитой ивы остролистной (*Salix acutifolia* Willd.).

Материалы и методы исследований. С целью оценки имеющегося производственного опыта и исследований формирования искусственных насаждений в условиях сухой степи Алтайского края в соответствии с общепринятыми в лесной таксации методиками (Анучин, 1977; ОСТ 56-69-83) было заложено 10 пробных площадей в наиболее распространенных типах леса.

Результаты и их обсуждение. Лесные культуры сосны, в которых проводились исследования, расположены в Степно-Михайловском лесничестве. В зависимости от типа условий местопрорастания они были разделены на две группы.

Группа 1 включает насаждения, сформированные в условиях свежего бора (Свб) – пробные площади – 1, 2, 3, 4, 5, 6. Культуры созданы весенней посадкой двухлетних сеянцев сосны обыкновенной. Посадка – механизированная. Начальная густота и схема посадки варьируют. Ширина шелюговых кулис находится в пределах от 6 до м. Очищенность ствола от сучьев – хорошая. Живой напочвенный покров представлен злаками, подрост отсутствует. Подрост единственный, по размерам мелкий, жизненное состояние – благонадежный и сомнительный. Мощность лесной подстилки варьирует от 1 до 5 см.

Группа 2 представлена насаждениями, сформированными в условиях типа леса – сухой бор пологих всхолмлений (СБП), пробные площади – 7, 8, 9, 10. Культуры созданы весенней посадкой двухлетних сеянцев сосны обыкновенной. Посадка – механизированная. Начальная густота и схема посадки варьируют. Ширина шелюговых кулис находится в пределах от 6 до 12 м. Очищенность ствола от сучьев – хорошая. Живой напочвенный покров и подрост отсутствуют. Подрост мелкий, по состоянию – сомнительный. Мощность лесной подстилки варьирует от 1 до 2 см.

Таблица 1

Распределение деревьев по классам роста в культурах сосны

№ПП	Тип леса	Рельеф	Возраст, лет	Густота, шт./га	Классы роста, %							
					I	II	III	IVa	IVб	Va	всего	сред-ний
1	СВБ	вершина	55	596	24,8	38,3	14,8	14,8	1,3	6	100	II,4
2		вершина	62	2240	4,3	22,6	28,8	25,2	0,8	18,3	100	III,1
3		вершина	60	1320	6	47,8	23,9	12,5	4	5,8	100	II,6
4		низина	60	1696	5,2	42,2	23,8	14	1,6	13,2	100	II,9
5		низина	62	856	8,9	55,6	25,7	4,2	1,4	4,2	100	II,4
6		ровный	63	1160	18,3	33,8	20,3	15,9	2,4	9,3	100	II,6
7	СБП	вершина	60	2488	3,2	40,7	29,4	15,9	1	9–,8	100	II,8
8		вершина	60	2080	5,4	41,3	28,5	15,6	1,2	8	100	II,8
9		низина	62	1740	3,9	46	26	13,8	0,9	9,4	100	II,4
10		низина	62	2020	5,3	40,9	26,9	15,4	2	9,5	100	II,8

Распределение деревьев по классам роста показывает (см. табл. 1), что в лесных культурах преобладают деревья I–III класса роста и развития (по Крафту). Несмотря на близкие значения средних классов роста (II,4–III,1), в насаждениях имеются существенные различия в соотношении между деревьями, занимающими господствующее положение и отстающими в росте. В более благоприятных лесорастительных условиях свежего бора при различной густоте в культурах наблюдается повышенное количество деревьев, относящихся к угнетенным в различной степени (IV–V классы роста и развития). В то же время в насаждениях сухого бора отмечается преобладание деревьев II класса роста и развития. Наибольшее количество отстающих в росте деревьев отмечено в насаждении пробы-2 (тип леса – СВБ). В насаждениях сосны, расположенных в сухом бору, долевое участие деревьев, занимающих различное положение в пологе, имеет близкое и мало зависящее от рельефа значения. Сравнение основных таксационных показателей свидетельствует о том (табл. 2), что в изреженных насаждениях сосна сформировала более толстомерные стволы с диаметром от 15,5 до 19,7 см. Их высота находится в пределах от 15,6 до 18,4 м (ПП-1,3,5,6). Значительное отставание в росте имеет сосна в загущенных посадках (ПП-2, 4, 7, 8, 9, 10). Здесь средний диаметр деревьев составляет от 11,8 до 13,2 см, а высота 13,3–15,8 м.

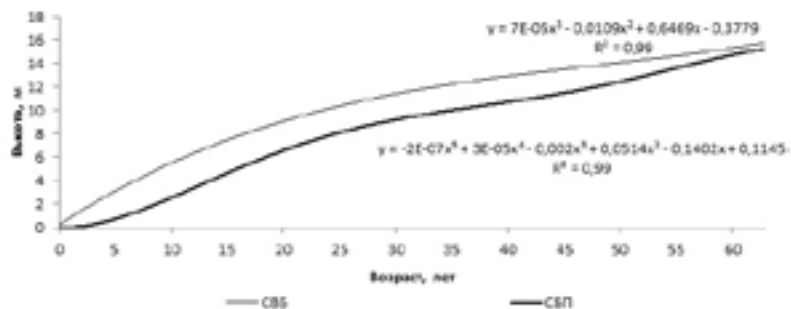
Исследуемые культуры сосны относятся к средне и высокополнотным древостоям. Их возраст находится в стадии перехода от средневозрастного к приспевающему. Класс бонитета в свежем бору варьирует от I до IV, в сухом бору представлен III и IV. Древостои характеризуются как средне- и низкопродуктивные и лишь отдельные – как высокопродуктивным. Древостои в отдельных случаях характеризуются преобладанием тонкомерных деревьев.

Ход роста сосны по высоте в искусственных сосняках характеризуется возрастающей кривой (см. рис.). Отмечается существенное отставание в росте деревьев в сухом типе леса с первых лет после посадки. Кульминация прироста сосны по высоте в сухом бору наступает в возрасте 10 лет, в свежем бору раньше. В послекulминационный период более интенсивный рост сосны в высоту сохраняется в свежем бору.

Таблица 2

Таксационная характеристика культур сосны

Проба	Возраст, лет	Густота, шт./га	Средние		Сумма площ. сеч, м²/га	Бонитет	Полнота, единица	Запас, м³/га		Средний прирост, м³/га
			диаметр, см	высота, м				растущий	сухостоя	
Тип леса – свежий бор										
1	55	596	19,1	18,3	17,1	I	0,5	141	0,7	2,5
2	62	2240	12,3	14,8	26,8	III	0,8	200	0,2	3,2
3	60	1320	15,5	15,6	25,1	III	0,7	188	3,5	3,1
4	60	1696	13,2	12,1	23,4	IV	0,7	145	0,3	2,4
5	62	856	19,7	16,8	26,1	III	0,7	202	0,4	3,2
6	63	1160	15,7	18,4	22,5	II	0,6	187	3,8	2,9
Тип леса – сухой бор пологих всхолмлений										
7	60	2488	11,9	15,8	27,4	III	0,8	214	1,2	3,5
8	60	2080	11,8	13,4	22,7	IV	0,7	159	0,8	2,6
9	62	1740	13,2	13,3	24,0	IV	0,8	170	0,3	2,7
10	62	2020	13,0	14,3	26,9	III	0,8	190	0,9	3,0



Ход роста культур по высоте

Выводы. В жестких почвенно-климатических условиях юго-западной части ленточных боров в условиях сухого бора пологих всхолмлений и свежего бора в режиме самоизреживания формируются средние и высокополнотные искусственные насаждения сосны I–IV классов бонитета. В 55–63-летнем возрасте при среднем диаметре стволов от 12 до 20 см в древостоях накопилось от 141 до 214 м³/га древесины. На лесотаксационные показатели древостоев оказывает влияние густота лесных культур и всхолмленность рельефа.

Библиографический список

- Анучин Н.П. Лесная таксация. М., 1977. 512 с.
- Грибанов Л.Н. Степные боры Алтайского края и Казахстана. М., 1960. С. 155.
- ОСТ 56-69-83 Пробные площади лесоустроительные, метод закладки. 59 с.
- Парамонов Е.Г., Ртищев С.Я., Маленко А.А. Лесовосстановление на гарях в условиях сухой степи // Плодородие. 2008. № 1. С. 34–35.
- Савин М.А., Курсикова Е.С., Маленко А.А. Формирование искусственных насаждений сосны в Кулундинской степи // Лесная наука Казахстана: достижения, проблемы и перспективы развития : материалы Междунар. науч.-практич. конф., посвященной 60-летию создания КазНИИЛХА. Щучинск, 2017. С. 395–399.
- Смирнов В.Е. Полувековой опыт лесовосстановления в ленточных борах Казахстана и Алтая. Алма-Ата, 1966. С. 140.
- Справочник по таксации лесов Казахстана. Алма-Ата, 1980. 313 с.

УДК 630:577.23 (571.15)

М.И. Семенов, А.А. Маленко

*Алтайский государственный аграрный университет (Барнаул,
Россия)*

Использование всей биомассы заготовленной древесины – рациональный путь развития экономики лесных предприятий Алтайского края

На примере ЗАО «Ларичихинский леспромхоз» Алтайского края рассматривается возможность использования всей биомассы от заготовленной древесины с целью использования для производства теплоэлектроэнергии и хлорофилло-каротиновой пасты. Полученное количество теплоэлектроэнергии закрывает потребность производства и обеспечивает теплом объекты ЖКХ лесного поселка. Объемы технической зелени от всех видов рубок позволяют ежегодно получать 64 т хлорофилло-каротиновой пасты, используемой для добавки к кормам для вскармливания скота и птицы. Дополнительная прибыль от производства хлорофилло-каротиновой пасты составит около 26 млн руб. В настоящее время в ООО «Алтай-Форест» в с. Ларичиха после ввода в эксплуатацию электростанции мощностью 0,4 МВт полностью решается проблема использования отходов переработки древесины.

Ключевые слова: древесные отходы, хвоя, переработка, теплоэлектроэнергия, хлорофилло-каротиновая паста, прибыль.

Алтайский край – малолесный район (лесистость 21%), но традиционно является одним из лидеров в Российской Федерации по глубине механической переработки древесины и использования расчётной лесосеки. Это позволило увеличить объёмы производимой продукции за последние пять лет на 25% в основном без большого увеличения объёмов лесозаготовок. В то же время, учитывая удовлетворённый спрос на производимую сегодня продукцию (пиломатериалы, строганный пагонаж, домостроение) и отсутствие воз-

возможности увеличения объёмов заготовки древесины, прогнозируется стагнация экономики в лесопромышленном комплексе, если работать по традиционно сложившимся и постоянно применяемым технологиям. К тому же ввиду географического положения, транспортной недоступности к неиспользуемым лесным массивам объёмы заготовок древесины в ближайшее десятилетие не могут увеличиваться.

В процессе заготовки древесины, её механической переработки получаются отходы в объёме до 70% от биомассы. С глубиной переработки этот процент будет увеличиваться. Создаётся парадоксальная картина, когда, с одной стороны, во время углубленной переработки цельной древесины создаётся продукция с добавленной стоимостью, а с другой – идёт процесс увеличения объёмов отходов с дополнительными затратами на их уничтожение. Это приводит к увеличению издержек в производстве.

В то же время на лесных предприятиях используется покупное электричество, доля которого в себестоимости продукции достигает до 20–25%. Анализ показывает, что самые крупные статьи затрат при производстве всех видов лесопроductии составляют расходы на древесное сырьё, а также затраты на топливо и теплоэлектроэнергию, сумма которых в относительном исчислении достигает 40–50%. Причём эти статьи затрат связаны между собой. Самой невыгодной продукцией лесозаготовок являются топливные дрова, стоимость которых в 3,5 раза меньше себестоимости заготовки. Это делает актуальным их использование в качестве энергетического сырья.

Снижение затрат на энергию положительно скажется на эффективности всего лесопромышленного комплекса. Таким образом, развитие энергетики на древесном топливе совершенно заслуженно входит в перечень критически важных технологий, утвержденных правительством страны. Анализ, проведённый ГНЦ ЛПК методом анкетирования, показал, что себестоимость электроэнергии, производимой на ТЭС, принадлежащих предприятиям ЛПК, находится в диапазоне 0,4–1,3 руб./квт. час, что в 2–3 раза меньше местных тарифов на покупную электроэнергию.

В 2011 г. ЭНИН с привлечением ведущих научных и проектных организаций по заказу Министерства энергетики РФ разработал про-

ект – Программа модернизации электроэнергетики России до 2020 г. На всю программу планируются капиталовложения – 11,1 трлн руб., на все виды ВИЭ – 0,2 трлн руб. (2%), на БиоТЭС – 0,06 трлн руб. (60 млрд руб.). Предполагается к 2020 г. увеличить мощности, использующие ВИЭ, более чем в два раза, до 5590 мВт, для чего необходимо довести ежегодный ввод мощностей биоТЭС до 150 мВт (Левин, 2012).

Сотрудниками кафедры лесного хозяйства Алтайского ГАУ проведены исследования в ООО «Ларичихинский ЛПХ» Тальменского района по наличию ресурсов древесного топлива и хвои, получаемых в процессе лесозаготовок и переработки древесины с целью использования для производства теплоэлектроэнергии и хлорофилло-каротиновой пасты (Томчук Р.И., Томчук Г.Н., 1973).

Ларичихинский ЛПХ – это сравнительно небольшое по современным показателям лесопромышленное предприятие, взявшее в аренду на 49 лет лесной фонд площадью 50 тыс. га и ежегодным объёмом пользования 45 тыс. м³ древесины. По нашим данным, всего получено ресурсов топлива 23,4 тыс. плотн. м³, при сжигании которого в котлах ДКВР-10-12-225 ПМ Бийского котельного завода и выработке электроэнергии двумя турбогенераторами П 0,6-16/6 Калужского турбинного завода номинальной мощностью 600 квт каждый можно выработать 2,5 Мвт/час электроэнергии и 7 тыс. Гкал. теплоты. Это больше, чем фактически потребленное количество энергии в 2014 г. При этом закрывается потребность производства в тепле и электричестве. Будут обеспечены теплом объекты ЖКХ в Ларичихе. Ожидаемая прибыль в год, по нашим расчётам, от этого вида пользования составит около 20 млн руб. Переход на производство собственного тепла и электричества отвечает распоряжению Правительства РФ от 08.01.2009 №1Р, определяющему основные направления государственной политики в сфере повышения экономической эффективности электроэнергии на основе использования возобновляемых источников на период до 2020 г.

Проведены расчёты по ресурсам технической зелени от всех видов рубок на производство хлорофилло-каротиновой пасты. Их объём с учётом потерь составляет более 1,4 тыс. т, что позволяет получать 64 т пасты. Спрос на нее в сельском хозяйстве Алтайского края,

согласно расчетов, составляет около 5 тыс. т. Это без учета вскармливания скота и птицы на личном подворье. Расчёты показывают, что добавка к кормам этого продукта позволяет за счёт увеличения привесов на 20% улучшить эффективность, а лесопромышленное предприятие получит дополнительную прибыль около 26 млн руб. Сравнительный анализ этого показателя с прибылью, полученной от производства пиловочника, равной 16 млн руб., убедительно доказывает необходимость строительства цеха по переработке технической зелени, что выгодно для производителей и потребителей продукции.

По предварительным расчетам, инвестиции в строительство ТЭС составят 61–65 млн руб., цеха по выработке пасты – около 13 млн рублей. Срок окупаемости строительства ТЭС составит около 3,5 лет, а цеха – менее одного года. Требуются инвестиции для осуществления этих проектов. Запуска предлагаемых производств, кроме решения вопросов энергообеспечения и биодобавок к кормам, закупаемых сегодня за рубежом, автоматически решает задачу социального развития, связанную с занятостью населения и улучшением его покупательской способности.

Можно с уверенностью сказать, что предлагаемые варианты абсолютно реальны. В настоящее время в ООО «Алтай-Форест» в с. Ларичиха завершается строительство электростанции мощностью 0,4 МВт, а после ее ввода на 100% закроется вопрос использования отходов переработки древесины. В ближайшие годы предприятие будет в состоянии начать осваивать лесосечные отходы по предлагаемым вариантам, что позволит ему сделать резкий рывок в сторону улучшения экономики, использования лесных ресурсов.

Библиографический список

- Левин А.Б. Биоэнергетика – важнейшее средство повышения энергоэффективности лесного комплекса России // Лесной вестник МГУЛ. 2012 (91). № 38. С. 160–165.
- Томчук Р.И., Томчук Г.Н. Древесная зелень и ее использование в народном хозяйстве. М., 1973. 360 с.

УДК 628 (075)

Г.Г. Соколова

Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

Технологии биотестирования в экологическом контроле состояния окружающей среды

Рассматриваются возможности использования технологий биотестирования для оценки состояния окружающей среды. Приводятся стандартизированные методики определения токсичности сред, дается перечень групп живых организмов, которые используются как биотест-системы для оценки экологической токсичности почвенной и водной сред и класса опасности отходов производства.

Ключевые слова: биотестирование, биотест-системы, экологический контроль.

В настоящее время в природоохранной деятельности активно используются технологии биотестирования с целью комплексной оценки природных сред с учетом реакции живых организмов. Результаты физико-химических анализов дают представление о видах и уровнях загрязнения, но по ним невозможно судить о влиянии токсикантов на живые организмы. Кроме того, данные методы могут быть неэффективными при определении загрязнений малой концентрации. Живые организмы способны реагировать на достаточно низкие уровни загрязнения, не регистрируемые приборами.

Технологии биотестирования используются для экологического анализа и контроля состояния природных сред и техногенных объектов. Особое внимание уделяется методам биотестирования при контроле суммарной экологической токсичности почв, грунтов, донных отложений, поверхностных и сточных вод, химических отходов и др. (Бубнов и др., 2007; Загребин и др., 2014). Актуальной на современном этапе развития науки является оценка методами биотестирова-

ния создаваемых наноматериалов, которые могут оказывать генотоксический эффект на живые системы.

Под биотестированием понимают методы и технологии установления экологической токсичности природных и техногенных объектов для живых организмов (Куценко, 2004; Филенко, Михеева, 2007). Показателями токсического влияния веществ на организмы могут быть морфологические, биохимические, физиологические, гистологические и биофизические изменения процессов их жизнедеятельности (Биологический контроль ..., 2007; Ерещенко и др., 2013). Наиболее информативными являются интегральные показатели, характеризующие общее состояние живого организма: численность, биомасса, смертность, плодовитость и др. Технологии тестирования, в отличие от физико-химических методов анализа состояния окружающей среды, являются менее материально затратными, более простыми, доступными и оперативными в плане применения.

Разработаны и применяются международные стандарты определения загрязнения методами биотестирования (Фомин, Фомина, 2001): Международный стандарт ИСО 11269-1. Определение загрязнения по задержке роста корня; Международный стандарт ИСО 11269-2. Определение загрязнения по развитию и росту растений.

Востребованность технологий биотестирования демонстрирует Приказ Министерства природных ресурсов (МПР) России №511 от 2001 г. «Критерии отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды», в котором регламентируется использование биологических тест-систем для оценки экотоксичности и класса опасности отходов. В реестр стандартизированных методик внесены следующие методы биотестирования:

- ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.1-96 (ПНД Ф Т 16.2:2:2.1-96. Методика определения токсичности вод, почв и донных отложений по ферментативной активности бактерий (колориметрическая реакция));
- ПНД Ф СБ 14.1.77-96. Методическое руководство по гидробиологическому и бактериологическому контролю процесса биологической очистки на сооружениях с аэротенками;
- ПНД Ф Т 16.2:2.2-98. Методика определения токсичности почвы и донных осадков по хемотаксической реакции инфузорий (АОЗТ «Спектр-М»):

- ПНД ФТ 14.1:2:3:4.2-98. Методика определения токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий;
- ПНД Ф Т 16.2:2.2-98. Методика определения токсичности проб почв, донных отложений и осадков сточных вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер»;
- ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98 (издание 2015 года). Методика определения токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных, талых, технологических вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер»;
- ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 (ПНД Ф Т 16.1:2:2.3:3.7-04). Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления;
- ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04). Методика определения интегральной токсичности поверхностных, в том числе морских, грунтовых, питьевых, сточных вод водных экстрактов почв, отходов, осадков сточных вод по изменению интенсивности бактериальной биOLUMИнесценции тест-системой «Эколюм»;
- ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06 (ПНД Ф Т 16.1:2:2.3:3.9-06). Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета;
- ПНД Ф Т 14.1:2:3.13-06 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.10-06). Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg;
- ПНД Ф Т 14.1:2.14-06 (ПНД Ф Т 16.1:3.11-06). Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L.;
- ПНД Ф Т 16.3.12-07. Методика определения токсичности золошлаковых отходов методом биотестирования на основе выживаемости парameций и цериодафний;

- ПНД Ф Т 14.1:2:4.15-09 (ПНД Ф Т 16.1:2:2.3:3.13-09). Методика выполнения измерений индекса токсичности почв, почвогрунтов, вод и отходов по изменению подвижности половых клеток млекопитающих *in vitro*;
- ПНД Ф Т 14.1:2:4.16-09 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.14-09). Методика измерений относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления;
- ПНД Ф Т 16.3.15-09. Методика определения токсичности водных вытяжек из галитовых отходов и глинисто-солевых шламов, образующихся при производстве калийных удобрений, по снижению темпа роста (изменению численности клеток) морских водорослей *Phaeolactylum tricornutum*;
- ПНД Ф Т 16.3.16-10. Методика определения токсичности отходов производства и потребления экспресс-методом с применением прибора серии «БИОТЕСТЕР»;
- ПНД Ф Т 16.1.17-10. Методика выполнения измерений интенсивности потребления тест-субстратов микробными сообществами почв и почвоподобных объектов фотометрическим методом;
- ПНД Ф Т 14.1:2:4.19-13. Методика определения токсичности питьевых, грунтовых, поверхностных и сточных вод, растворов химических веществ по измерению показателей всхожести, средней длины и среднего сухого веса проростков семян кресс-салата (*Lepidium sativum*);
- ФР.1.31.2012.11560. Методика измерений биологической активности гуминовых веществ методом фитотестирования;
- ФР.1.39.2014.18039. Методика измерений токсичности почв по реакциям энхитреид.

Для биотестирования природных сред и техногенных объектов чаще всего используются:

- 1) бактерии;
- 2) простейшие (инфузория *Paramecium caudatum*);
- 3) низшие ракообразные (дафния *Daphnia magna*, цериодафния *Ceriodaphnia affinis*, артемия *Artemia salina*);

- 4) водоросли (пресноводные – *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda*, морские – *Phaeodactylum tricornutum*);
- 5) высшие растения (семена однодольных и двудольных растений);
- 6) млекопитающие (культура половых клеток быка *in vitro*);
- 7) сальмонелла (*Salmonella typhimurium*).

Для оценки токсичности вод, почв и донных отложений используют показатель изменения ферментативной активности бактерий. Бактериологический контроль процесса бактериологической очистки воды осуществляется в аэротенках на очистных сооружениях. Люминесцентные бактерии родов *Vibrio* (*V.harveyi*, *V.fisheri*), *Photobacterium* (*P.phosphoreum*, *P.leiognathi*) и другие используются в качестве тест-культуры для определения токсичности вод, почв и донных отложений. Реакция люминесцентных бактерий на токсические вещества полностью соответствует реакции других биологических организмов (животных, высших растений и человека). В России производятся тест-системы на основе морских и пресноводных генно-инженерных светящихся бактерий.

Простейшие инфузории (*Paramecium caudatum*) массово обитают в пресных водах с высоким содержанием органических веществ, являясь α -мезосапробами. В сточных водах они являются основным видом, питаются бактериями и гниющими остатками. Методика определения токсичности золошлаковых отходов методом биотестирования основана на выживаемости парамеций и цериодафний (Руководство..., 2001).

Планктонные виды ветвистоусых рачков (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*) легко культивируются, имеют короткий цикл развития, поэтому наиболее часто используются для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления в РФ и других странах. Испытания с применением дафний могут проводиться как в лабораторных условиях, так и в полевых условиях. Определение токсичности основано на изменении выживаемости и плодовитости рачков. Для оценки степени токсичности загрязненных высокоминерализованных почв, отходов или морских вод используются тест-культура солоноватоводных рачков *Artemia salina*.

Водоросли широко используются для оценки токсичности веществ различных классов (тяжелых металлов, хлора, фосфоро- и хлорорганических соединений, поверхностно-активных веществ и др.). Они включены в число обязательных объектов исследований по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов загрязняющих веществ в воде, а также при определении класса опасности сточных вод. Для биотестирования пресноводных водоемов наиболее часто применяют *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris* и *Pseudokirchneriella subcapitata*, для биотестирования засоленных вод, как правило, используют культуру диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum*. Метод биотестирования с применением культуры водорослей основан на определении их численности, прироста, биомассы, интенсивности процесса фотосинтеза, содержание пигментов, изменение цвета клеток и т.д.

Фитотестирование широко применяется для определения токсичности почв. Фитотоксичность почв оценивают по изменениям листовых органов, побегов, корневой системы, биомассы, всхожести, энергии прорастания, скорости роста и пр. (Лисовицкая, Терехова, 2010; Терехова, 2011). Для определения токсичности проб необходимо использовать мелкие семена с небольшим запасом питательных веществ (например, редиса, салата и других растений).

Индекс токсичности почв, почвогрунтов, вод и отходов можно оценивать по изменению подвижности половых клеток млекопитающих *in vitro*. Методика основана на фиксации изменений двигательной активности сперматозоидов под воздействием химических токсинов (Циприян и др., 1993).

Для выявления мутагенного эффекта токсикантов используется тест-система на основе специально сконструированных штаммов-мутантов на основе лабораторного штамма *Salmonella typhimurium* LT2, разработанная американским ученым Б. Эймсом. Созданные им штаммы широко используются в исследованиях для оценки мутагенной активности. Тест Эймса с 1997 г. включен в систему разработки рыбохозяйственных ПДК. Имеются ограничения использования данного теста в отношении таких канцерогенов, как уретан, 1,2-диметилгидразин, диэльдрин, канцерогенные металлы.

При участии сотрудников кафедр биологического факультета и факультета почвоведения МГУ в лаборатории экотоксикологического анализа почв (ЛЭТАП) создана и поддерживается коллекция стандартизованных культур тест-организмов разных трофических уровней и таксономической принадлежности (Методы биотестирования..., 1989; Биотест-системы..., 2014). Проводится работа по созданию и внедрению аналогов токситов, европейских вариантов хранения и распространения тест-культур. Это новое поколение биотестов, предназначенное для оценки токсичности среды и содержащее тест-организмы в анабиотическом состоянии (эфиппиумы дафний (resting eggs), покоящиеся яйца коловраток, яйца артемии, культуры водорослей).

Библиографический список

Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование. М., 2007. 288 с.

Биотест-системы для задач экологического контроля: методические рекомендации по практическому использованию стандартизованных тест-культур. М., 2014. 48 с.

Бубнов А.Г., Буймова С.А., Гущин А.А., Извекова Т.В. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды. Иваново, 2007. 112 с.

Ерещенко О.В., Хлебова Л.П., Соколова Г.Г. Фитоиндикационная оценка современного экологического состояния городских экосистем // Ломоносовские чтения на Алтае-2013 : материалы Международной научной конференции, 5–8 ноября 2013 г. Барнаул, 2013. Т. 6. С. 257–261.

Загребин А.О., Румянцев В.А., Тонкопий В.Д. Использование методов биотестирования и биоидентификации ксенобиотиков для оценки состояния водоемов // Среда обитания. 2014. №1. С. 157–160.

Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб., 2004. 504 с.

Лисовицкая О.В., Терехова В.А. Фитотестирование: основные подходы, проблемы лабораторного метода и современные решения // Доклады по экологическому почвоведению. 2010. Вып. 13, №1. С. 1–18.

Методы биотестирования качества водной среды / под ред. О.Ф. Филленко. – М., 1989. 124 с.

Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. М., 2001. 74 с.

Терехова В.В. Биотестирование почв: подходы и проблемы // Почвоведение. 2011. №2. С. 190–198.

Филенко О.Ф., Михеева И.А. Основы водной токсикологии. М., 2007. 144 с.

Фомин Г.С., Фомина А.Г. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. М., 2001. 305 с.

Циприян В.И., Коршун М.М., Дацюк Д.Е. Экотоксикологическая оценка качества почвы // Гигиена и санитария. 1993. №1. С. 25–28.

УДК 633.11:581.143.5:631.524.02

Л.П. Хлебова¹, Е.Д. Никитина², В.А. Петин¹, М.А. Красилов¹

¹Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

²Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий (Барнаул, Россия)

Создание клеточных культур и регенерантов пшеницы, устойчивых к тяжелым металлам

Выявлен меж- и внутривидовой полиморфизм по регенерационной способности среди тестируемых сортов мягкой и твердой пшеницы в присутствии никеля в питательной среде ионов. Установлен нелинейный характер взаимосвязей между частотой регенерации *in vitro* и концентрацией селективного агента, что затрудняет выбор сублетальной дозы поллютанта. Рекомендуется использовать концентрации металла, при которых возможна регенерация в культуре ткани у сортов, представляющих интерес для селекции.

Ключевые слова: клеточная селекция, пшеница, никель, эксплант, незрелый зародыш, каллус, регенерант.

Введение. Технический прогресс, объективно обусловленный развитием человечества, неизбежно привносит во внешнюю среду все возрастающее количество отходов различных производств, большая часть которых является общетоксичной для биоты (Титов и др., 2007; Алексеев, 2008). В связи с этим все более актуальной становится проблема сокращения вредных выбросов во внешнюю среду, в том числе тяжелых металлов, входящих в класс поллютантов, а также снижение их влияния на организм человека. Решение проблемы просматривается в русле двух концептуальных подходов – техногенного и биологического. Экономически и экологически более безупречным является биологический подход, направленный на выявление из генофонда и создание новых форм растений, способных к низкому накоплению тяжелых металлов в товарной части продукции (Гамзикова, Барсукова, 1999; Жученко, 2001).

Расширение генотипического разнообразия по устойчивости к тяжелым металлам возможно за счет использования направленной селекции клеточных клонов и растений-регенерантов в условиях *in vitro* (Domozlicka, Opatrny, 1989; Гладков и др., 2006, 2013; Сергеева, Бронникова, 2016).

Материалы и методы. Исходным материалом служили сорта мягкой и твердой пшеницы с известной степенью устойчивости к никелю и реакцией на условия *in vitro*: Новосибирская 67, Алтайская 50, Чайниз Спринг, Алтайская Нива, Алтайка. В качестве эксплантов использовали незрелые зародыши в возрасте 15–16 суток. Селективной системой служила питательная среда Линсмайер и Скута (Linsmaier, Skoog, 1965), дополненная уксуснокислой солью никеля в концентрации от 12 до 20 мг/л, с шагом различия 2 мг/л. Всего испытано пять вариантов сред, повторность десятикратная. Реакцию клеточных культур оценивали по накоплению сухой биомассы и частоте регенерации.

Статистическую обработку данных проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа.

Результаты и обсуждение. Выполненное исследование позволило выявить нелинейную зависимость между накоплением массы

сухого вещества каллуса и дозой никеля в питательной среде у сортов как мягкой, так и твердой пшеницы. С повышением концентрации никеля в среде до 1 мг/л происходило увеличение биосинтеза органических веществ (рис. 1). В среднем сухой вес каллуса составил 6,3 мг для мягкой пшеницы и 10,6 мг – для твердой. Дальнейшее повышение дозы селективного агента приводило к снижению накопления сухого вещества. Однако при концентрации металла в интервале от 4 до 6 мг/л вновь активизировались процессы биосинтеза в клетках. Стабильное понижение биомассы происходило с дозы 12 мг/л.

Дисперсионный анализ данных показал существенность влияния всех изучаемых факторов (генотип, концентрация никеля и их взаимодействие) на изменчивость массы сухого каллуса мягкой пшеницы. Для сортов твердой пшеницы значимо лишь влияние концентрации никеля в питательной среде (табл.).

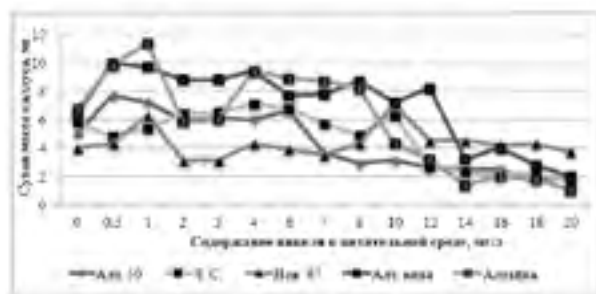


Рис. 1. Накопление сухой биомассы каллуса яровой мягкой и твердой пшеницы в зависимости от концентрации никеля в питательной среде

Анализ доли вклада в общую вариабельность признаков свидетельствует, что процесс накопления сухой биомассы у образцов *T. aestivum* в большей степени определяется взаимодействием «генотип» × «концентрация» (36,5%).

Влияние факторов «генотип» и «концентрация» проявляется в равной мере: 13,7 и 14,0% соответственно. Изменчивость сухого веса каллуса твердой пшеницы на 24% зависела от дозы никеля в субстрате.

Эффективность использования метода культуры тканей и клеток для селекционных целей определяется в первую очередь возможно-

стью получения растений-регенерантов (Бутенко, 1986; Григорьева, Шлецер, 2006). Данные по регенерации представлены на рисунке 2.

Влияние генотипа и концентрации никеля в питательной среде на накопление сухой биомассы каллуса *T. aestivum* и *T. durum*

Источник вариации	Масса сухого каллуса			
	мягкой пшеницы		твердой пшеницы	
	Ффакт.	Р (%)	Ффакт.	Р (%)
Генотип	17,3**	13,7	0,2	-
Концентрация	3,9**	14,0	2,4*	24,1
Взаимодействие	5,1**	36,5	0,6	-

Примечание: Ффакт. – фактическое значение

F-критерия по фактору;

Р – доля вклада фактора в общую изменчивость;

**, * – достоверно при однопроцентном и пятипроцентном уровне значимости соответственно.

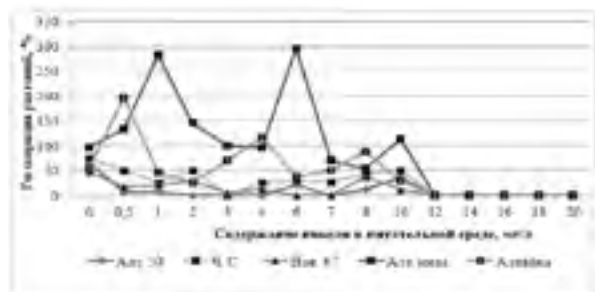


Рис. 2. Регенерация растений *T. aestivum* и *T. durum* в зависимости от концентрации никеля в питательной среде

Морфогенетическая реакция на селективный агент у генотипов мягкой и твердой пшеницы различна. Если клеточные культуры *T. durum* способны регенерировать растения при концентрации металла до 10 мг/л, то для некоторых сортов мягкой пшеницы присутствие в питательной среде никеля в дозе 2 мг/л блокировало продуцирование соматклонов.

Частота регенерации в каллусных культурах мягкой пшеницы во всех опытных вариантах оказалась ниже, чем в контроле, и зависела от дозы никеля. Резкое снижение выхода растений наблюдали в диапазоне концентраций от 3 до 7 мг/л. Увеличение нагрузки никеля до 8–10 мг/л способствовало повышению частоты регенерации у всех тестируемых сортов.

Клеточные линии твердой пшеницы при невысоких дозах селективного агента (0,5–1,0 мг/л) повышали уровень регенерации. Сорт Алтайская нива реагировал с некоторым «запозданием». Так, если для сорта Алтайка эффективными оказались концентрации никеля 0,5, 4, и 8 мг/л, то для Алтайской нивы – 1, 6 и 10 мг/л. Регенерационные процессы сводились к нулю при повышении концентрации с 12 до 20 мг/л, исключение составила Алтайская нива (73,3%). В таком случае следует использовать селективные системы с уровнем фактора ниже порогового значения.

Заключение. Таким образом, выявлен меж- и внутривидовой полиморфизм по регенерационной способности среди тестируемых сортов мягкой и твердой пшеницы на нагрузки никеля в питательной среде. Нелинейный характер взаимосвязей между частотой регенерации и концентрацией селективного агента затрудняет выбор сублетальной дозы никеля, которая обычно используется при клеточной селекции. Поэтому следует ориентироваться на дозы металла, при которых возможна регенерация у сортов, представляющих интерес для селекции.

Библиографический список

- Алексеев Ю.В. Тяжелые металлы в агроландшафте. СПб., 2008. 216 с.
- Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в селекционном процессе // Состояние и развитие сельскохозяйственной биотехнологии : материалы Всесоюзной конференции. Москва, июнь 1986 г. Л., 1986. С. 29–38.
- Гамзикова О.И., Барсукова В.С. Изменение устойчивости пшеницы к тяжелым металлам // Доклады РАСХН. 1996. № 2. С. 13–15.
- Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Гладкова О.В. Клеточная селекция газонных трав, толерантных к ионам меди // Биотехнология. 2006. № 5. С. 53–58.
- Гладков Е.А., Долгих Ю.И., Гладкова О.В. Использование клеточной

селекции для получения толерантных к тяжелым металлам газонных трав // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15. № 3 (4). С. 1258–1261.

Григорьева Л.П., Шлецер И.А. Скрининг сортов пшеницы по способности к морфогенезу в культуре незрелых зародышей *in vitro* // Известия Алтайского государственного университета. 2006. № 3 (41). С. 64–66.

Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). М., 2001. Т. 1. 780 с.

Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И. Клеточная селекция с ионами тяжёлых металлов для отбора осмоустойчивых форм растений // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты) : материалы VII Международ. конф. Симферополь, 2016. С. 332–333.

Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам. Петрозаводск, 2007. 172 с.

Domozlicka E., Opatrny Z. The effect of cadmium on tobacco cell culture and the selection of potentially Cd resistant cell lines // Biol. Plant. 1989. Vol. 31 (1). P. 19–27.

Linsmaier E., Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture // Physiol. Plant. 1965. Vol. 18. N 1. P. 100–127.

СОДЕРЖАНИЕ

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Н.Е. Агансонова

Эффективность продуктов метаболизма
симбиотических бактерий энтомопатогенных нематод
против *Globodera rostochiensis* W. на картофеле.....4

О.В. Бычкова, А. Оразов

Клональное микроразмножение плодовых,
ягодных и декоративных культур
в Алтайском центре прикладной биотехнологии9

О.В. Бычкова, Л.П. Хлебова, А. Оразов

Особенности введения в культуру
in vitro *Rhodiola algida* (Ledeb.).....13

О.Ю. Воронкова

Ресурсный потенциал Алтайского края
в направлении развития
органического сельскохозяйственного производства19

О.А. Высоцкая

Формирование спроса
на рынке биотехнологических продуктов
для органического сельского хозяйства27

О.А. Высоцкая

Формирование регионального кластера
производителей и переработчиков органической продукции...32

А.В. Гребенищикова, А. Н. Иркитова

Сравнение антагонистической активности
коллекционных и ризосферных штаммов *Bacillus subtilis*.....39

С.А. Доброхотов, А.И. Анисимов Использование биологических средств защиты растений в органическом земледелии.....	47
М.А. Заугольникова, И.Д. Бородулина, О.В. Бычкова, Т.В. Плаксина Методы биотехнологии в размножении ягодных культур.....	53
Е.М. Зуева, Н.И. Владимиров Некоторые показатели состава молока коз разных пород пригородной зоны Барнаула.....	58
В.Н. Кельбин, Е.С. Сколотнева, Е.М. Сергеева, С.И. Конькова, Е.А. Салина Фитопатологические и молекулярные подходы для изучения инфекционных стадий гриба <i>Rusticia graminis</i> , развивающегося в условиях лесостепи Приобья.....	62
И.В. Киргизова, А.М. Гаджимурадова Влияние вирусной инфекции картофеля (PVY ⁰) и (PVS ^A) на биохимические показатели уровней антиоксидантных ферментов у разных генотипов картофеля	73
В.Г. Луницын Биотехнологические методы переработки продукции пантового оленеводства.....	83
Е.С. Плющёва, О.В.Бычкова, Л.П.Хлебова, Е.В. Орлова Технология получения генетически модифицированных корней <i>Tagetes patula</i>	97
Н.Ю. Сперанская, И.Ю. Евдокимов Изучение стабильности биоконсерванта для заготовки зеленой массы кормов для сельскохозяйственных животных в процессе хранения	103
А.М. Титова, Л.П. Хлебова, О.В. Бычкова, В.А. Петин, М.А. Красилов Роль осмолитов в осмотической регуляции мягкой пшеницы в условиях индуцированного стресса <i>in vitro</i>	107
Л.П.Хлебова, О.В. Бычкова, М.А. Розова, А.И. Зиборов Гистологические особенности морфогенных каллусов яровой твердой пшеницы	111

Л.П. Хлебова, Е.Д. Никитина

Морфогенетические процессы в длительно культивируемых каллусах яровой мягкой пшеницы	116
---	-----

ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьникова

Синергизм экзогенных антиоксидантов в пищевых продуктах	124
--	-----

Л.В. Анисимова, Солтан Осама Исмазил Ахмед

Влияние добавки пажитника и брусники на качество овсяной муки при хранении	135
---	-----

О.В. Байбакова

Осахаривание целлюлозосодержащих субстратов из мискантуса для биосинтеза бактериальной целлюлозы.....	145
---	-----

О.В. Березина, С.В. Рыков, В.В. Зверлов, С.В. Яроцкий

Биосинтез гемицеллюлаз из <i>Aspergillus cervinus</i> в рекомбинантных штаммах <i>Escherichia coli</i> и <i>Pichia pastoris</i>	149
---	-----

С.А. Бобровская, Е.Ю. Шуилова, А.В. Протопопов

Полимеризация подсолнечного масла, выделенного из отходов маслоэкстракционного производства...	161
---	-----

Д.С. Голубев, Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба, Н.В. Бычин

Термический анализ бактериальной целлюлозы, полученной на ферментативных гидролизатах мискантуса	169
---	-----

И.Н. Гришаева, М.Г. Кротова

Способы переработки сырья маралов для получения биосубстанций функциональной направленности	175
---	-----

Р.В. Дорофеев, И.А. Функ, Т.Н. Орлова,

К.Е. Шевченко, Е.Ф. Отт

Бактериальная закваска для силосования кормов	183
---	-----

В.В. Ельчанинов, А.Н. Белов, А.Д. Коваль Выделение молокосвертывающих ферментов из утилизируемых технологических жидкостей методом хроматографии на Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high substitution).....	191
О.М. Завалишина Производство макаронных изделий с использованием различных видов муки	199
Е.П. Каменская, С.И. Камаева, В.А. Вагнер, А.А. Теплова Влияние экстракта пантокрина на метаболизм дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в технологии производства пива	207
М.Н. Колесниченко, В.А. Вагнер, И.Б. Дворяткина Перспективы использования кипрея узколистного в биотехнологии производства безалкогольных напитков.....	217
Е.А. Кузнецова, Л.В. Шаяпова, Я. Бриндза Технология хлеба из зерна тритикале, обогащенного флавоноидами гречихи	226
И.И. Кульбакина, К.В. Дмитриева, Е.Г. Ильина, Е.С. Яценко Влияние физико-химических факторов на <i>Bacillus subtilis</i>	232
К.А. Курилова, Б.П. Шипунов, Е.С. Яценко, Р.М. Яценко Влияние звукового воздействия на скорость размножения <i>Bacillus subtilis</i> в процессе культивирования.....	239
Ю.Е. Курис, А.В. Голод, А.Е. Бовина, А.В. Протопопов Химическая переработка растительных масел и их отходов маслоэкстракционных производств.....	241
Ю.Е. Курис, А.Н. Шлеина, Д.С. Вагина, А.В. Протопопов Получение новых продуктов из отходов растительного происхождения	247
В.А. Логинов, А.А. Майоров Технологические режимы выработки сыров в межсезонные периоды года	254

Е.А. Машенская, М.Н. Вишняк

Влияние порошка древесных грибов на хлебопекарные свойства муки и структурно-механические свойства теста261

М.В. Обрезкова, Е.П. Каменская

Получение мучного кондитерского изделия с использованием комбинированного экстракта из растительного сырья271

Т.Н. Орлова, Е.Ф. Отт, Р.В. Дорофеев

Селекция лактобактерий для производства ферментируемых молочных продуктов280

И.Н. Павлов

Оценка автогидролитической предварительной обработки мискантуса с помощью горячей воды в жидком состоянии290

М.Ю. Парфенов, Е.С. Яценко, Б.П. Шипунов

Хемотрезистентность *Bacillus subtilis*.....301

А.В. Пилигаев, Ю.В. Самойлова, К.Н. Сорокина, В.Н. Пармон

Разработка продуцента эстеразы бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* и ее применение в биотехнологии304

А.Ю. Просеков, Т.В. Вобликова

Микрокапсулирование бифидобактерий и их применение в производстве пищевых продуктов310

В.В. Ревин, Д.А. Кадималиев, Н.А. Пестов,

Е.В. Лияськина, Н.А. Атыкян, Н.В. Новокупец

Разработка перспективных функциональных и конструкционных биокомпозиционных материалов на основе микробных полисахаридов.....319

Н.С. Рыженков, Е.С. Яценко, И.В. Микушина

Оптимизация питательной среды для культивирования бактерий *Bacillus subtilis*.....324

М. Савина, А.Н. Иркитова

Современные области применения бактериофагов.....329

К.В. Сафиуллина, Е.А. Кренделева, В.А. Колодязная

Создание улучшенных продуцентов рекомбинантных белков с помощью метаболического инжиниринга клеток млекопитающих343

<i>Е.Ю. Сердюкова, Ю.В. Кожевникова, Е.А. Чернышева</i> Биомасса – источник сырья альтернативных видов топлива	348
<i>Р.Г. Тухбатуллина, М.П. Шулаева, Д. Кропачева</i> Разработка аппретированных систем из сырья растительного происхождения для лечения дерматологических заболеваний.....	355
<i>И.А. Функ, Е.Ф. Отт</i> Пробиотический полутвердый сыр с бифидобактериями.....	361
<i>М.В. Шурова, Г.В. Ларина, В.В. Олифиренко</i> Функциональные напитки на основе лекарственного растительного сырья и родниковых вод Республики Алтай	369
<i>В.В. Шутова, Е.А. Парашкина</i> Использование микробных альгинатов для получения экологически безопасных биокомпозиционных материалов	379
<i>Е.С. Яценко, С.С. Бойко, Р.М. Яценко</i> Оптимизация метода определения численности жизнеспособных спорных бактерий.....	390

ЛЕСНАЯ И ПРИРОДООХРАННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

<i>Н.В. Барышева, Л.П. Хлебова, И.А. Брумберг</i> Биотехнологические подходы к оценке патогенной микобиоты семян твердой пшеницы	397
<i>А.Я. Бондарев, Д.Ю. Гаврилова</i> Оптимизация агроландшафтов – важнейшая экологическая и биотехническая задача	402
<i>О.В. Бычкова, А. Оразов</i> Использование биотехнологических методов для сохранения редких и исчезающих видов растений	407

А.А. Маленко, Е.С. Курсикова Результаты использования семян сосны обыкновенной с закрытой корневой системой при облесении крупноплощадных гарей.....	413
С.В. Левин К вопросу о развитии лесосеменных плантаций кедра сибирского вегетативного типа создания в Республике Алтай	418
А.А. Маленко, В.А. Елизаров Влияние двухприёмных изреживаний на сортиментную структуру высокопродуктивных культур сосны в сухой степи	431
А.А. Малиновских, А.А. Маленко, А.С. Чичкарев Естественное возобновление сосны обыкновенной после выборочных и постепенных рубок в ленточных борах Алтайского края	436
М.А. Савин, А.А. Маленко Формирование искусственных насаждений сосны обыкновенной, созданных под защитой ивы остролистной	445
М.И. Семенов, А.А. Маленко Использование всей биомассы заготовленной древесины – рациональный путь развития экономики лесных предприятий Алтайского края.....	451
Г.Г. Соколова Технологии биотестирования в экологическом контроле состояния окружающей среды.....	455
Л.П. Хлебова, Е.Д. Никитина, В.А. Петин, М.А. Красилов Создание клеточных культур и регенерантов пшеницы, устойчивых к тяжелым металлам	462

Научное издание

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ОБЩЕСТВО В XXI ВЕКЕ

СБОРНИК СТАТЕЙ

Редактор Л.И. Базина

Подготовка оригинал-макета и дизайн обложки Ю.В. Плетнева

Издательская лицензия ЛР 020261 от 14.01.1997 г.

Подписано в печать 11.12.2018.

Формат 60х84 1/16. Усл.-печ. л. 27,67.

Тираж 80 экз. Заказ 531.

Типография ИП В.Н. Киселева