

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
**«Дальневосточный федеральный университет»**

---

**ШКОЛА ЭКОНОМИКИ И МЕНЕДЖМЕНТА**

**Кафедра товароведения и экспертизы товаров**

Базюх Павел Константинович

**ОПТИМИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ КОНВЕРСИИ РАСТИТЕЛЬНОГО  
СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ КОРМОВ**

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

по образовательной программе подготовки  
магистров по направлению «38.04.07 Товароведение»  
«Биоэкономика и продовольственная безопасность»

г. Владивосток  
2018

Автор работы \_\_\_\_\_  
(подпись)

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Консультант (если имеется)

\_\_\_\_\_ (подпись) \_\_\_\_\_ (Ф.И.О)

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018г.

Руководитель ВКР канд. биол. наук, профессор  
кафедры Товароведения и экспертизы товаров ШЭМ  
ДВФУ,

старший научный сотрудник ТИБОХ ДВО РАН им.  
Г.Б. Елякова

(должность, ученое звание)

\_\_\_\_\_ Балабанова Л.А.  
(подпись) (Ф.И.О)

« 03 » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Назначен рецензент канд. мед. наук Исаева

Марина Петровна

(фамилия, имя, отчество)

Защищена в ГЭК с оценкой \_\_\_\_\_

Секретарь ГЭК (для ВКР)

\_\_\_\_\_ (подпись) \_\_\_\_\_ (Ф.И.О)

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201 г.

«Допустить к защите»

Заведующий кафедрой \_\_\_\_\_  
(ученое звание)

\_\_\_\_\_ (подпись) \_\_\_\_\_ (Ф.И.О)

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201 г.

**ЗАВЕРЯЮ**

Е.Б. Гаффорова / \_\_\_\_\_ /  
Подпись

Директор Школы экономики и менеджмента  
Директор/ наименование структурного подразделения

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

**В материалах данной выпускной квалификационной работы не содержатся сведения, составляющие государственную тайну, и сведения, подлежащие экспортному контролю.**

Е.А. Тюрина / \_\_\_\_\_ /  
Подпись

Заместитель директора по науке и инновациям  
Школы экономики и менеджмента  
Уполномоченный по экспортному контролю

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

## Оглавление

Введение.....	4
1 Теоретические основы конверсии растительного сырья .....	7
1.1 Классификация методов конверсии растительного сырья .....	7
1.2 Микробная биоконверсия.....	14
1.2.1 Сырье для микробной биоконверсии.....	14
1.2.2 Технология микробной биоконверсии.....	16
1.2.3 Продукты микробной биоконверсии .....	26
1.3 Инновации в производстве кормов .....	31
2 Объекты и методы исследования .....	37
2.1 Выделение и идентификация мицелиальных грибов из природных источников .....	37
2.2 Скрининг штаммов мицелиальных грибов как продуцентов белка и целлюлаз.....	39
2.3 Оптимизация условий культивирования штаммов мицелиальных грибов .....	42
2.4 Определение профиля ферментативной активности штаммов мицелиальных грибов.....	43
2.5 Определение микотоксинов у штаммов мицелиальных грибов .....	45
2.6 Определение антибиотикочувствительности штаммов мицелиальных грибов .....	46
2.7 Транскриптомный анализ штамма-продуцента полисахарид-деградирующих ферментов, обеспечивающих полную конверсию растительных субстратов .....	46
3 Результаты и обсуждение исследования .....	49
3.1 Результаты выделения и идентификации штаммов мицелиальных грибов .....	49
3.2 Результаты скрининга штаммов мицелиальных грибов как продуцентов белка и целлюлаз.....	54
3.3 Результаты оптимизации условий культивирования штаммов мицелиальных грибов.....	59
3.4 Синтез полисахарид-деградирующих ферментов и гликозидаз у штаммов мицелиальных грибов.....	60
3.5 Безопасность использования штаммов термофильных и морских мицелиальных грибов.....	68
3.6 Антибиотикочувствительность штаммов мицелиальных грибов.....	68
3.7 Транскриптомный анализ штамма-продуцента полисахарид-деградирующих ферментов, обеспечивающих полную конверсию растительных субстратов .....	72
Заключение .....	79
Список использованных источников .....	81
Приложения .....	88

## Введение

Создание прочной кормовой базы – это не только увеличение производства и повышение качества кормов разных видов, но прежде всего внедрение высокоэффективных способов и средств их производства, приготовления, способствующих высокой усвояемости животными питательных веществ, содержащихся в кормах и обеспечивающих их рациональное использование.

В современном животноводстве большое внимание уделяется обеспечению сбалансированного питания животных. Применяя научно обоснованные системы кормления, можно повысить продуктивность животных и эффективно использовать корма. В процессе питания составные вещества воздействуют на организм животного не изолированно друг от друга, а в комплексе. Сбалансированность составных веществ корма в соответствии с потребностями животных – основной показатель этого комплекса.

Для животноводства важно не только количество, но, главным образом, качество кормов, т.е. их ценность, определяемая содержанием питательных веществ. Полноценными считаются такие рационы и корма, которые содержат все необходимые для организма животного вещества и способны в течение длительного времени обеспечить нормальные отправления всех его физиологических функций.

Под питательностью понимают свойство корма удовлетворять природные потребности животных в пище. Определить питательность корма можно только в процессе его взаимодействия с организмом по физиологическому состоянию животного и изменению его продуктивности. Питательность корма нельзя выразить каким-либо одним показателем. Проведенные учеными исследования роли отдельных питательных веществ в жизнедеятельности организма животного позволили сделать вывод о необходимости всесторонней системы оценки питательности кормов. Эта оценка складывается из следующих данных: химического состава корма и его калорийности; перевариваемость питательных

веществ; общей (энергетической) питательности; протеиновой, минеральной и витаминной питательности.

Интенсификация сельскохозяйственного производства в условиях рискованного земледелия, постоянный рост населения городов и сокращение пахотной земли на душу населения вызывают необходимость более полного использования имеющихся кормовых ресурсов.

Поэтому в наше время очень актуально получение высокоэффективных белково-углеводных кормов на основе растительных отходов. В качестве сырья могут выступать зерно любого качества, отруби, солома, полова, спиртовая барда, пивная дробина, свекловичный жом, лузга подсолнечника, отходы крупяных производств, корнеплоды, стержни кукурузных початков и другие компоненты грубых кормов отдельно или в смеси. Одним из перспективных способов обработки растительного сырья является его микробиологическая биоконверсия [18].

Грибы являются ценными продуцентами белков и ферментов, способными использовать в качестве субстрата мелассу, молочную сыворотку, сок растений, лигнин, клетчатку, целлюлозосодержащие отходы пищевой и деревообрабатывающей промышленности [55,56]. Белки грибного мицелия по содержанию незаменимых аминокислот близки к белкам сои. Они богаты лизином, имеют высокую биологическую ценность и усвояемость. Кроме того, в отличие от бактериальных и дрожжевых клеток, которые продуцируют ДНК в количестве, вызывающем интоксикацию у животных, концентрация нуклеиновых кислот и пуринов в грибном мицелии (1 – 4 % от сухой массы) почти такая же, как в тканях растительного организма. Однако в биомассе грибов синтезируется значительно меньше белка (20 – 60 % от сухой массы), чем в дрожжах, и у них относительно медленней происходит рост биомассы.

В связи с этим целью данной работы является исследование путей оптимизации микробиологической конверсии растительного сырья с помощью мицелиальных грибов для получения белковых кормов.

В соответствии с заданной целью были поставлены следующие задачи:

1. выделение и идентификация мицелиальных грибов из природных источников;
2. скрининг штаммов мицелиальных грибов как продуцентов белков и ферментов;
3. оптимизация сред для культивирования перспективных штаммов мицелиальных грибов;
4. определение субстратной специфичности полисахарид-деградирующих ферментов штаммов мицелиальных грибов;
5. определение антибиотикочувствительности штаммов для возможности их использования в модификации ферментного профиля.
6. транскриптомный анализ мицелиального гриба *Mycothermus thermophilus* - продуцента широкого спектра полисахарид-деградирующих ферментов и гликозидаз, обеспечивающих полную конверсию растительных субстратов.

Данная работа состоит из 87 страниц, включает введение, три главы, заключение, список литературы в количестве 73 использованных источников, 10 таблиц, 8 рисунков, а также приложения.

# **1 Теоретические основы конверсии растительного сырья**

## **1.1 Классификация методов конверсии растительного сырья**

В настоящее время разработано несколько десятков способов конверсии растительного сырья, что вызывает необходимость их классификации. Одна из классификаций конверсии растительного сырья для процессов гидролиза разработана Токаревым и Гельфандом. В основу классификации эти авторы положили критерий относительной скорости движения контактирующих фаз [11]. Если таковая равна нулю, то процесс называется статическим, если не равна нулю, то динамическим. В статических методах моносахара, образующиеся в процессе гидролиза, подвергаются разрушительному действию гидролизующей среды в течение всего процесса. При динамических методах конверсии моносахара подвергаются разрушению в течение меньшего периода времени, чем в статических, поэтому выход сахара при их использовании выше. Данную классификацию можно распространить на все методы конверсии растительного сырья.

Схема классификации методов конверсии в зависимости от относительной скорости движения фаз представлена на рис. 1.

Исторически технология конверсии растительного сырья развивалась от статических методов гидролиза к комбинированным и динамическим методам. Стремление увеличить выход сахара привело к идее создания ступенчатого статического гидролиза (метод Шоллера). Он отличается тем, что варка древесного или растительного сырья проводилась в несколько приёмов. Каждый раз гидролизат отделяли, сырьё заливали свежим раствором кислоты и гидролиз на каждой ступени проводили при более высокой температуре. Выход сахара составлял 35-40% от абсолютно сухого сырья. Статический метод гидролиза с минимальным количеством жидкой фазы может быть осуществлён не только путём смачивания сырья раствором кислоты, но также и насыщением сырья газообразным кислым реагентом, например, серным ангидридом или хлористым водородом. При этом достигается выход моносахаров 96-98% от теоретического. Непрерывный гидролиз преследовал цель полной механизации процесса, резкого

увеличения производительности реактора за счёт ликвидации вспомогательных операций и увеличения температуры, а главное, увеличения выхода сахара. Примером непрерывного статического метода конверсии может быть процесс брожения осахаренного зернового затора, осуществляемый в разных аппаратах, но последовательно и непрерывно.



Рисунок 1 – Классификация методов конверсии растительного сырья по относительной скорости движения фаз

Динамические непрерывные методы характеризуются наличием определённой скорости движения жидкой фазы (газообразной фазы) относительно твёрдой фазы. Данный метод в бывшем СССР был реализован в виде перколяционного и двухфазного способов гидролиза.

Непрерывные динамические методы гидролиза можно подразделить на прямоточные, противоточные, противоточные с перекрёстным и смешанным током.

Рассмотренная классификация подсказывает возможность создания комбинированных методов конверсии, т.е. таких, в которых могут сочетаться статические и динамические методы конверсии в прямой и обратной последовательности.

Холькин классифицировал основные методы гидролиза по группам признаков, относящихся к химической кинетике гидролиза полисахаридов, макрокинетике и технике проведения гидролиза растительного сырья [46].

Все способы переработки растительного сырья можно разделить на три группы: физические, химические (конверсии), биологические (биоконверсии). Физическими методами конверсии являются измельчение, прессование (отжим) и др. В основе конверсии растительного сырья химическими методами лежат способы гидролиза полисахаридов кислотами, щелочами и растворами солей. К биологическим методам конверсии относят процессы ферментативного гидролиза и ферментации.

В биотехнологии, как правило, все эти способы сочетаются. Наиболее перспективными способами конверсии растительного сырья являются:

1. Физические – размол в вибромельницах и дробилках, прессование, экструзионная обработка, дефибрационный способ измельчения, радиолиз, ультразвук.

*Измельчение* является самым распространённым способом механической конверсии из-за низкой энергоёмкости, простоты организации, и большого количества видов установок и аппаратов для осуществления этого процесса, которые можно использовать в разных случаях. В большинстве случаев измельчение растительного сырья осуществляют в несколько ступеней. Их количество зависит от вида растительного сырья, от начального размера частиц, и от требуемого конечного размера частиц сырья. На каждой ступени используются свои установки.

*Радиолиз.* При облучении целлюлозы дозой порядка  $5 \times 10^8$ - $5 \times 10^9$  рад в ней значительно возрастает содержание легкогидролизуемой фракции. При облучении хлопковой целлюлозы дозой  $6 \times 10^8$  рад она на 98% растворяется в холодной воде.

При радиолизе древесины дозой  $6 \times 10^8$  рад растворимость древесины в 10% растворе серной кислоты при  $t=100^\circ\text{C}$  увеличивается с 22% до 67%, а выход редуцирующих веществ (РВ) – с 18 до 42%. Эти результаты возрастают с увеличением температуры процесса.

Однако экономичность процесса радиолиза зависит от стоимости электроэнергии, затрачиваемой на облучение. Указанные дозы облучения увеличивают затраты на гидролиз древесины, и в настоящее время данный способ не имеет промышленного применения. Кроме того, при существующем уровне техники используемое оборудование громоздко.

Совмещение процессов радиолиза и обработки материала в парах углекислого газа позволило получить целлобиозу и глюкозу. Глубокий распад целлюлозы объясняют действием продуктов диссоциации углекислого газа.

Данный процесс можно проводить в присутствии целлюлолитических ферментов, то есть сочетать физико-химическую обработку с энзиматическим катализом. Возможно использование также лигниназ [12].

*Ультразвук (УЗ)* – это упругие колебания и волны в диапазоне частот 104-109 Гц. Ультразвук – эффективное физическое средство для воздействия на физико-химические свойства материалов. Ультразвуковая обработка материалов используется в различных технологических процессах (растворение, очистка, обезжиривание, крашение, измельчение, пропитка, эмульгирование, экстрагирование, кристаллизация, полимеризация, предотвращение образования накипи, гомогенизация, эрозия, биохимические процессы, химические и электрохимические реакции и др.) с целью их ускорения (в 10-1000 раз), увеличения выхода продукта и повышения его качества. Метод перспективен при использовании в пищевой, фармацевтической, парфюмерной, биотехнологической и других отраслях промышленности [33].

2. Химические (классификация по виду химического реагента):

- гидролиз разбавленными кислотами – перколяционный, высокотемпературный, автогидролиз;
- гидролиз концентрированными кислотами – двухфазный гидролиз (на первой фазе гидролиз концентрированной серной кислотой с непрерывной отдувкой фурфурола паром, на второй фазе гидролиз целлюлигина разбавленной серной кислотой перколяционным методом) и гидролиз галогенсодержащими кислотами;
- гидролиз солями – перколяционный, экструзионная обработка с солями;
- гидролиз газообразными агентами – предгидролиз в парах CO<sub>2</sub>, гидролиз в парах SO<sub>2</sub>;
- щелочная делигнификация – паровой взрыв и методы выделения целлюлозы.

Способы кислотного гидролиза имеют более широкую сферу применения (перколяционный гидролиз, двухфазный гидролиз, автогидролиз), их используют в гидролизном производстве для получения этилового спирта, кормовых дрожжей, фурфурола, глюкозы, ксилита. Данные методы гидролиза используют для трудногидролизуемого сырья, к которому относят целлюлозосодержащее и пенозансодержащее сырьё, а также для крахмалсодержащего сырья (некондиционное зерно отруби и другие отходы переработки зерна) [16].

При гидролизе растительного сырья разбавленными кислотами возникают трудности применения единого режима вследствие большой разницы в скоростях гидролиза гемицеллюлоз и целлюлозы [38,31].

Недостаток химической обработки в том, что она дает побочные продукты реакции, обладающие токсическим действием на организм. При кислотном гидролизе растительного материала образуются такие токсины, как метанол, формальдегид, ацетон, летучие фенолы, фурфурол и его производные, муравьиная кислота. Как кислотный, так и щелочной гидролиз приводит к деградации аминокислот, образованию продуктов их конденсации с углеводами и другими соединениями. Поэтому использование химических агентов для предобработки

растительного сырья требует тщательных исследований механизма и кинетики процессов с целью получения продуктов гидролиза заданного состава и качества. [17,26].

3. Биологические:

- биоконверсия растительного сырья ферментами;
- прямая биоконверсия растительного сырья микроорганизмами (выращивание микроорганизмов, различные виды брожения);
- биоконверсия растительного сырья ферментами и микроорганизмами;
- биоконверсия растительного сырья после химических методов гидролиза.

К биологическим методам конверсии растительного сырья относят ферментативный гидролиз и микробиологическую ферментацию. Микробиологические ферментационные процессы можно разделить на анаэробные и аэробные.

К анаэробным процессам относятся все процессы брожения (спиртовое, молочнокислое, пропионовокислое, маслянокислое, метановое).

Аэробные процессы – это процессы выращивания микроорганизмов в присутствии кислорода воздуха с целью получения биомассы (биосинтез белка) или продуктов метаболизма, которые находятся в клетках или вне клеток микроорганизмов.

Все ферментационные процессы также можно разделить в зависимости от физического состояния питательного субстрата. Питательный субстрат из растительного сырья может быть в виде суспензии или в виде осветлённого раствора. При выращивании микроорганизмов с целью получения белка на неосветлённом субстрате получают углеводно-белковый продукт, на осветлённом – биомассу микроорганизмов.

Как правило, процессы культивирования микроорганизмов на твёрдых и суспензионных субстратах можно осуществить несколькими путями:

1. поверхностным или глубинным культивированием микроорганизмов, образующих ферментные системы, катализирующие расщепление целлюлозы,

гемицеллюлоз, пектина и лигнина и хорошо растущих на лигноцеллюлозных материалах – процессы прямой биоконверсии [36];

2. культивированием микроорганизмов после ферментативной обработки растительных отходов или при совместном использовании ферментов и микроорганизмов;

3. выращиванием микроорганизмов на целлюлозо- и гемицеллюлозосодержащих отходах после их предварительной химической обработки (щёлочью, кислотой или солями), при которой разрушается лигноуглеводный комплекс, аморфизуется целлюлоза [1,5].

Первые два пути широко используются в производстве белка и других биологически активных веществ. Третий путь, возможно использовать только в технологических схемах, где предусматривается разделение целевых продуктов микробиологического синтеза и питательного субстрата, так как иначе используемые химические катализаторы гидролиза полисахаридов растительных отходов будут входить в состав продуктов и ухудшать их качество.

Осветлёнными субстратами в промышленном производстве являются нейтрализованные осветлённые сернокислотные гидролизаты растительного сырья и сульфитные шелока. Их используют в производстве этилового спирта и кормовых дрожжей [21,29].

4. Комбинированные:

- механохимические – дефибрация или размол в присутствии кислот или солей;

- термохимические – прямое сжигание, пиролиз, газификация, сжижение, быстрый пиролиз, синтез метанола из газа, образующегося при термической конверсии биомассы древесины;

- сочетание физических и химических методов выше перечисленных, например, радиолиз в атмосфере CO<sub>2</sub> и др [6,48].

## 1.2 Микробная биоконверсия

### 1.2.1 Сырье для микробной биоконверсии

Среди продуктов микробной биоконверсии растительного сырья можно выделить несколько групп: корма с повышенным содержанием легкоусвояемых веществ, протеинизированные корма (с повышенным содержанием белка), белковые пищевые продукты, растительные белковые гидролизаты, обезвреженные продукты и корма. Питательным субстратом для микроорганизмов может служить доступное, дешевое сырье, в том числе отходы перерабатывающих отраслей агропромышленного комплекса.

В процессах микробной биоконверсии используют необработанное растительное сырье (прямая биоконверсия) или сырье, подвергнутое предварительной обработке механическими, химическими, электрохимическими, радиационными методами, а также с помощью ферментных препаратов.

На рисунке 2 представлена микробная биоконверсия растительного сырья

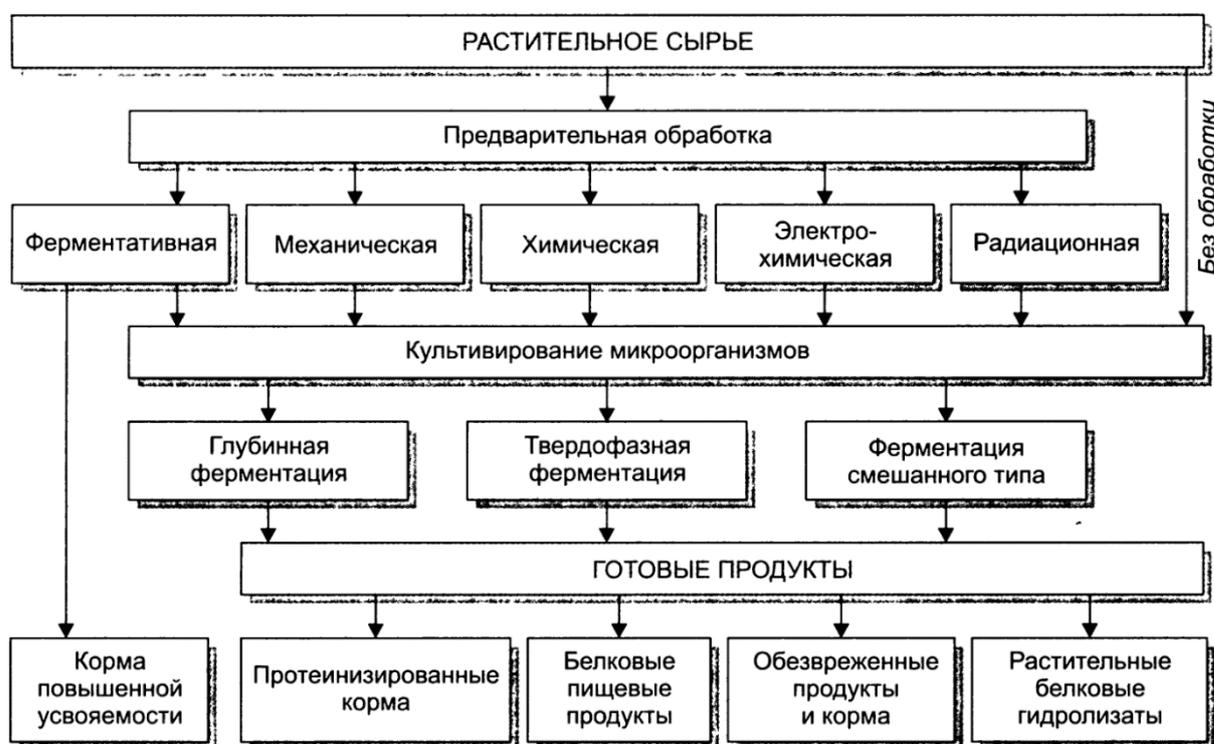


Рисунок 2 – Микробная биоконверсия растительного сырья

Прямая биоконверсия целесообразна при переработке жидких субстратов с достаточно высоким содержанием легкоусвояемых соединений углерода и азота. При переработке твердых субстратов прямую биоконверсию применяют при наличии микроорганизмов с мощными ферментными системами, способными воздействовать на биополимеры сырья, прежде всего на структурные биополимеры.

Основными источниками сырья для микробной биоконверсии служат отходы пищевой промышленности и сельскохозяйственного производства. Отходы сельскохозяйственного производства (солома злаков, початки, стебли и листья кукурузы, стебли и корзинки подсолнечника, ботва различных корнеплодов, отходы виноградной лозы, чайных плантаций, стебли табака и пр.) обладают низкой кормовой ценностью из-за наличия трудногидролизуемых полисахаридов и невысокого содержания белка. В некоторых видах сельскохозяйственных отходов присутствуют компоненты, затрудняющие использование на корм скоту.

Отходы пищевой промышленности более богаты питательными веществами, безвредны, легче поддаются ферментативной и микробной биоконверсии, различным видам предобработки. Это сырье – наиболее перспективное для биоконверсии. Количество вторичных ресурсов в пищевой промышленности составляет 60-80 % от перерабатываемого сырья, в некоторых случаях достигает 95 %.

Способы переработки растительного сырья определяются его составом. Основу растительной биомассы составляют полимеры углеводной природы – целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин, а также лигнин и белок. Последний – наиболее ценный питательный компонент, однако количество белка даже в наиболее богатых им видах сырья не превышает 26 %. Исключение составляют семена бобовых культур, где содержание белка достигает 50 %. Очень бедны белком солома злаков, лузга подсолнечника, отходы хлопчатника, чая, для их превращения в ценные корма и белковые продукты требуется глубокая биоконверсия [34].

В процессе биоконверсии из продуктов расщепления углеводов и из минеральных солей азота и других элементов синтезируется микробный белок. Увеличение содержания белка – основной показатель эффективности биоконверсии растительного сырья в пищевые продукты и корма.

Из числа углеводов сравнительно легко гидролизуются ферментами микроорганизмов крахмал и пектиновые вещества, гемицеллюлоза занимает промежуточное положение, а наиболее трудногидролизуются целлюлоза и лигнин. Соответственно труднее всего поддаются прямой биоконверсии субстраты с высоким содержанием целлюлозы и лигнина, такие как древесина, солома, ботва, одревесневшие части растений. В результате прямой биоконверсии эти виды сырья лишь незначительно обогащаются белком. Для повышения степени конверсии в белок трудногидролизуются виды сырья подвергают предварительной обработке различными способами [8].

### **1.2.2 Технология микробной биоконверсии**

Культивирование микроорганизмов. Микробную биоконверсию растительного сырья осуществляют путем глубинной, твердофазной или ферментации смешанного типа. Выбор способа культивирования зависит от вида сырья и физиологических особенностей микроорганизмов, используемых при биоконверсии.

Двухступенчатую ферментацию смешанного типа применяют при необходимости двухстадийной биоконверсии сырья различными штаммами микроорганизмов. Такая ферментация проводится, например, при биологической детоксикации кормов с высоким содержанием афлатоксинов.

Разработка технологии культивирования включает обязательные стадии: выбор штамма микроорганизма, выбор способа культивирования и определение оптимальных параметров технологического процесса.

Выбор культуры микроорганизмов определяется, прежде всего, их способностью продуцировать целевой продукт на сырье, подлежащем

биоконверсии. Для прямой биоконверсии растительного субстрата в белковый кормовой продукт можно использовать один штамм микроорганизмов, обладающий комплексом ферментов для гидролиза субстрата и синтеза белка на основе продуктов гидролиза, или ассоциацию из двух и более штаммов, среди которых есть микроорганизмы с высокой активностью гидролитических ферментов и микроорганизмы, активно синтезирующие белок (принцип «разделения труда»).

Например, получение белковых кормов на основе мелассы проводят с помощью одного вида микроорганизма – пекарских дрожжей, а при биоконверсии соломы дрожжи необходимо сочетать с другими микроорганизмами, поскольку дрожжи не обладают целлюлозолитической активностью. В качестве микроорганизмов, гидролизующих солому, можно использовать грибы пенициллы, а в продукты гидролиза соломы вносить культуру дрожжей.

Выбор микроорганизма – продуцента белка облегчается, если есть возможности для предобработки сырья, которая частично заменяет действие гидролитических ферментов микроорганизмов. При выборе микроорганизмов принимают во внимание ограничения, связанные с имеющимся арсеналом технологического оборудования. Аппаратурное оформление процесса культивирования должно обеспечивать соблюдение оптимальных технологических параметров.

Выбранный штамм микроорганизмов, помимо способности синтезировать целевой продукт на определенном виде сырья, должен обладать генетической стабильностью (способностью сохранять биосинтетический потенциал длительное время в условиях промышленного производства); высокой скоростью роста; устойчивостью к инфекции; способностью к выживанию в достаточно широком диапазоне параметров внешней среды (рН, температуры, концентрации кислорода и элементов питания). Предпочтительно использовать спорообразующие формы микроорганизмов, так как они имеют более высокую генетическую стабильность, чем вегетативные формы, и более удобны для размножения в чистой культуре [3].

Подготовка посевного материала. Качество и количество посевного материала в значительной мере определяют результат культивирования микроорганизмов на субстрате биоконверсии. Посевного материала должно быть достаточно, чтобы обеспечить быстрое развитие микроорганизмов в питательной среде. Это особенно важно при выращивании микроорганизмов на нестерильных средах, когда продолжительная лаг-фаза микроорганизма-продуцента может способствовать развитию инфицирующих форм, содержащихся в среде или поступающих из воздуха.

При выращивании грибов, обладающих способностью к спороношению (конидиеобразованию), в качестве посевного материала используют поверхностные культуры, которые получают выращиванием на твердых средах – отрубях, свекловичном жоме, крупах, ломтях моркови и пр. Культуры должны обильно спороносить, количество спор – 0,5-3 млрд/г сухой культуры. Расход посевной культуры грибов на единицу массы среды составляет при глубинном культивировании около 0,005 %, при твердофазном – около 0,01 %.

Перед использованием посевного материала его активируют. Культуру заливают стерильным раствором минеральных солей, иногда с добавлением биостимуляторов (экстракта солодовых ростков, кукурузного экстракта, триптического гидролизата казеина, отдельных сахаров, аминокислот), получают суспензию спор, которую переносят в колбу и ставят в термостатируемую качалку на 6-12 ч. Споры набухают и прорастают, что сокращает лаг-фазу роста в основной ферментации.

Спороносящие бактерии выращивают в виде пленок на твердых или жидких питательных средах в течение времени, необходимого для перехода культуры в стадию спороношения (1-3 сут.). Расход посевного материала (по массе среды, на которой он выращен) – 0,002-0,03 %. Активация посевного материала не требуется. Пленки на жидких средах используются непосредственно, пленки на твердых средах (отрубях, ломтях картофеля, крупах) заливают стерильной водой, взбалтывают и полученной суспензией засевают производственную питательную среду.

Посевной материал спороносящих культур грибов и бактерий, выращенный на отрубях и крупяных твердых средах, может храниться при комнатной температуре в течение месяца и более без потери биологического потенциала. Посевной материал неспороносящих форм микроорганизмов расходуется в больших количествах – от 3 до 10 % к объему засеваемой среды. При малых дозах посевного материала вегетативные формы микроорганизмов развиваются очень медленно.

Выращивание вегетативных форм микроорганизмов ведут ступенчато. Классическим примером является получение пекарских дрожжей на мелассе. Дрожжи из пробирки с чистой культурой пересевают несколько раз в последовательно возрастающие объемы питательной среды, сохраняя дозировку посевного материала 10 %. Аналогично поступают при получении культуральной жидкости продуцентов белка, аминокислот, ферментов и пр.

При периодическом культивировании микроорганизмов такая технология доставляет много хлопот. Поэтому культивирование вегетативных форм стараются проводить в непрерывном режиме, если позволяют технологические характеристики процесса. Примерами непрерывных процессов, основанных на культивировании вегетативных форм микроорганизмов, являются получение пищевых и кормовых дрожжей, производство этанола, уксусной кислоты [4,13].

Выбор способа культивирования определяется физиологическими особенностями микроорганизмов и свойствами сырья для биоконверсии. Как отмечалось ранее, существуют два основных способа культивирования – поверхностный (на поверхности жидких и сыпучих питательных сред) и глубинный (осуществляющийся в толще жидкой питательной среды). Поверхностный способ (чаще – твердофазный) осуществляется в периодическом режиме, глубинный – в периодическом и различных вариантах непрерывного культивирования.

Исторически первой сложилась технология твердофазного культивирования, возникшая в Юго-Восточной Азии в условиях кустарного

производства ферментных препаратов. Твердофазное культивирование – это выращивание микроорганизмов на увлажненных, хорошо аэрируемых твердых (сыпучих) средах.

Основой сред могут служить отруби зерновых культур, крупы, лигноцеллюлозные субстраты, свекловичный жом и пр. Эти компоненты при необходимости дополняют минеральными солями, растворы которых используют для увлажнения субстратов. Влажность питательных сред, в зависимости от вида культивируемого микроорганизма, составляет 55-75 %.

Питательные среды стерилизуют, засевают культурами микроорганизмов, перемешивают для равномерного распределения посевного материала, а затем раскладывают в кюветы тонким слоем (3-5 см). Кюветы помещают в растительные камеры с регулируемой температурой и влажностью. Современный вариант твердофазного культивирования - это выращивание микроорганизмов в механизированных растительных камерах вертикального или горизонтального типа при толщине слоя культуры 30-50 см.

По окончании твердофазного процесса получают культуру в виде плотной, подсохшей массы с содержанием сухих веществ 50-65 %. До 30 % сухих веществ составляют водорастворимые компоненты – ферменты, неактивные белки, пептиды, аминокислоты, олиго- и полисахариды, нуклеиновые соединения, минеральные вещества.

Преимуществами твердофазного культивирования являются: возможность использования крупнодисперсных субстратов, хорошие физические свойства среды, обеспечивающие высокий уровень тепло- и массообменных процессов в культуре.

Микроорганизмы растут в условиях, близких к естественным, при фиксации на субстрате, который при этом быстро и полно используется. Микроскопические грибы при твердофазном культивировании имеют истинно мицелиальный, а не пеллетный рост и, соответственно, высокую скорость синтеза белка. Мицелий не повреждается механически, как это имеет место в глубинной культуре. Наконец,

готовая культура имеет низкую влажность, что облегчает получение товарной формы.

Твердофазное культивирование применяют почти исключительно для выращивания мицелиальных грибов. Одноклеточные микроорганизмы в твердой фазе выращивают в тех случаях, когда они имеют тенденцию к образованию нитевидных, мицелиальных форм, то есть обладают диморфизмом. Это относится к родам *Candida*, *Endomycopsis*, в глубинной культуре эти организмы ведут себя как одноклеточные, а в поверхностной растут по типу мицелиальных грибов.

Для выращивания бактерий, одноклеточных дрожжей и актиномицетов применяют глубинный способ культивирования. Он успешно используется и для мицелиальных грибов. Глубинное культивирование проводят в ферментерах, снабженных перемешивающими устройствами, системами аэрации, термо- и рН-регуляции. Питательные среды стерилизуют в ферментерах или установках непрерывной стерилизации. В технологии биоконверсии растительного сырья часто используют нестерильные среды. Концентрация питательных компонентов в средах не превышает 25 %, обычно составляя 5-10 %. В состав питательных сред входят минеральные соли, стимуляторы роста, источники органических соединений углерода и азота, последние – в водорастворимой или мелкодисперсной форме.

Преимущества глубинного способа выращивания: высокий уровень механизации и автоматизации процесса; возможность ведения процесса в условиях стерильности, регулируемого рН и состава среды, а также в непрерывном режиме, при котором значительно повышаются экономические показатели и обеспечивается генетическая стабильность микроорганизмов-продуцентов. Непрерывное культивирование используется в тех процессах биоконверсии, где образование целевого продукта связано с накоплением биомассы и достигает максимума в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы. Это имеет место, например, в процессах микробного синтеза белка.

Переход к непрерывному процессу осуществляют следующим образом. В экспоненциальной фазе роста культуры включают проток свежей среды со скоростью, равной удельной скорости роста микроорганизмов, что обеспечивает сохранение уровня концентрации биомассы в ферментере. Поступление свежей питательной среды снимает ингибирование роста микроорганизмов продуктами обмена.

Как правило, при непрерывном культивировании удельная скорость роста и биосинтеза целевых продуктов выше, чем при периодическом. Снижается расход компонентов питательной среды, поскольку для притока используются более бедные среды, чем для периодического культивирования. Повышается коэффициент использования оборудования, уменьшается расход энергии и количество сточных вод. В длительных непрерывных процессах за счет автоселекции стабилизируется генотип микроорганизмов, что приводит к повышению продуктивности.

Упрощенный вариант непрерывного процесса – это отъемно-доливной способ культивирования. Он имеет более низкие технологические характеристики, поскольку периодический отъем и долив среды вызывает физиологический шок культуры микроорганизмов и временное снижение скорости роста после долива.

Наиболее примитивный вариант непрерывного способа – доливной, когда к небольшому объему культуральной жидкости постепенно добавляют свежие порции среды до заполнения резервного объема ферментера. Доливной способ позволяет лишь частично корректировать состав среды, что дает незначительные преимущества перед периодическим способом культивирования [10].

Режимы культивирования. Выбор оптимального режима культивирования включает определение следующих параметров: состава среды, рН, температуры, уровня аэрации среды, влажности среды и подаваемого воздуха (для твердофазного процесса), вида пеногасителя (для глубинного процесса), продолжительности культивирования.

При получении обогащенных или обезвреженных кормов основой среды является обогащаемый или обезвреживаемый корм, к которому добавляются минеральные элементы, в небольших количествах и тех видов, которые допустимы в составе корма (соли аммония, сульфат магния, сульфат или хлорид калия, фосфаты, сульфат или хлорид кальция, микроэлементы). При твердофазном культивировании, где в ходе роста рН среды не регулируется, солевой состав подбирают так, чтобы обеспечить наименьшие отклонения рН среды от оптимальной величины.

Кислотность среды должна соответствовать оптимуму для роста микроорганизмов. Обычно рН устанавливают в интервале 5-7. В условиях глубинного культивирования рН регулируют подачей водного аммиака или растворов слабых кислот (ортофосфорной, уксусной).

В период активного роста микроорганизмов температуру среды поддерживают на оптимальном для роста уровне. Оптимальная температура роста для мезофильных бактерий составляет 30-37 °С, для дрожжей и грибов 26-30 °С. Термофильные формы микроорганизмов имеют оптимальную температуру роста до 65 °С, в зависимости от температуры естественной среды обитания. В начальной стадии культивирования спорообразующих форм микроорганизмов устанавливают температуру несколько выше оптимальной для вегетативного роста, с целью активировать прорастание спор. Так, культивирование спороносных бактерий с оптимумом роста 37 °С начинают при температуре 43-45 °С.

Заключительные стадии процессов биоконверсии, связанных с образованием вторичных метаболитов или детоксикацией растительных материалов, проводят при температуре, оптимальной для биоконверсии, которая обычно несколько ниже оптимальной для роста.

При твердофазном культивировании температуру среды поддерживают подачей воздуха или воды с соответствующей температурой в рубашку установки. При глубинном культивировании терморегуляцию осуществляют подачей горячей или холодной воды в рубашку ферментера.

Аэрацию жидких питательных сред увеличивают по мере ускорения роста и накопления биомассы микроорганизмов. Аэрация усиливается за счет барботажа и перемешивания жидкости. Диспергирование продуваемого воздуха необходимо, поскольку микроорганизмы поглощают только растворенный кислород.

При твердофазном культивировании воздух расходуется не только на аэрацию, но и на теплообмен, поэтому воздух находится в сфере роста всегда в достаточном количестве. Расход воздуха в зависимости от возраста культуры и типа растительной установки колеблется в пределах 3-30 м<sup>3</sup>/ч • кг абсолютно сухих веществ культуры. Влажность подаваемого воздуха должна быть 98-100 %, что необходимо для предотвращения высыхания твердофазной культуры.

Важным элементом технологии глубинного культивирования является пеногашение. Вспенивание среды вызывается наличием таких компонентов, как крахмал, декстрины, белки, пептиды, глюкозиды, пектиновые вещества. Вспенивание приводит к потере культуральной жидкости в результате уноса с газообразной фазой.

Для предотвращения вспенивания применяют природные и синтетические пеногасители, чаще вторые (адеканолю, пропинолу и др.). Наиболее сильное вспенивание происходит в фазе активного роста, что связано с выделением белков из клеток активно размножающейся культуры, а также с высоким уровнем аэрации среды в этот период.

При культивировании анаэробных микроорганизмов (клубридий, некоторых видов молочнокислых бактерий и др.) среды не аэрируют, но производят постоянное или периодическое перемешивание для активизации массообмена. Анаэробы выращивают только глубинным способом.

Продолжительность культивирования микроорганизмов определяется кинетикой роста, накопления целевых продуктов, потребления компонентов среды.

Рост клеточной популяции представлен на рисунке 3.

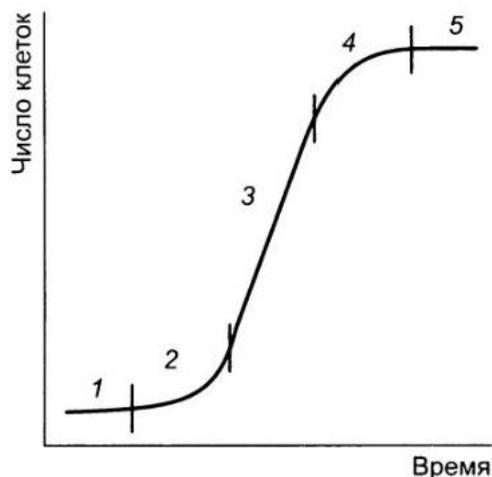


Рисунок 3 – Рост клеточной популяции при культивировании в накопительном режиме: 1 – латентная фаза; 2 – экспоненциальная фаза; 3 – линейная фаза роста; 4 – фаза замедления роста; 5 – стационарная фаза

Основной прирост биомассы происходит в логарифмической, или экспоненциальной, фазе (2), когда рост не лимитирован накоплением в среде продуктов обмена и идет пропорционально количеству клеток в культуре. В фазе замедления роста (4) рост тормозится накоплением микробных метаболитов и истощением питательных элементов в среде. В стационарной фазе (5) устанавливается равновесие процессов роста и автолитического отмирания клеток. После стационарной фазы происходит отмирание культуры – деструктивные процессы становятся преобладающими, величина биомассы снижается (в пределе – до полного исчезновения).

При получении белковых продуктов целесообразно вести процесс до начала стационарной фазы, то есть до момента накопления максимальной биомассы и белка. Дальнейшее культивирование приводит к ненужному расходу питательных веществ среды и снижению количества белка в корме. Поэтому важно уметь определить, прямо или косвенно, динамику накопления биомассы.

При выращивании микроорганизмов глубинным способом на питательных средах, не содержащих взвешенных частиц, прирост биомассы определяют

турбидометрически – по величине оптической плотности культуральной жидкости при соответствующем разбавлении, с учетом оптической плотности незасеянной питательной среды. На практике часто используют питательные среды с диспергированными частицами различной величины, часть которых сохраняется в культуральной жидкости до конца процесса культивирования, так что определение биомассы турбидиметрическим способом неприменимо.

Очевидно, что оптические методы неприменимы и к твердофазному процессу. Поэтому широко используются косвенные методы, основанные на определении динамики сопряженных с ростом показателей, таких как выделение тепла и поглощение кислорода. Активно растущие культуры интенсивно выделяют тепло и поглощают кислород, снижение и последующая стабилизация этих показателей соответствуют переходу в фазу замедления роста и стационарную фазу. У большинства микроорганизмов при выращивании на средах, содержащих легкоусвояемые соединения углерода и азота, максимум накопления биомассы и белка достигается не позднее суток. На средах с трудногидролизуемыми субстратами процесс идет 3-10 суток.

Необходимая продолжительность ферментации может быть определена по динамике накопления целевых продуктов или утилизации компонентов среды (в частности, токсинов – в процессах детоксикации). При этом используются соответствующие аналитические методы, предпочтительно в экспресс-модификациях [39,28].

### **1.2.3 Продукты микробной биоконверсии**

Микробную биоконверсию растительного сырья в основном проводят с целью получения кормов, обогащенных белком и ферментами, белковых пищевых продуктов, а также для детоксикации пищевых продуктов и кормов.

Микробный синтез белка позволит расширить и качественно улучшить пищевую базу, получить высококачественные продукты, затрачивая минимум труда и не нанося ущерба окружающей среде. Микробному белку по сравнению с животным и растительным белком присущи следующие преимущества:

- большая скорость роста микроорганизмов (микроорганизмы растут в 500 раз быстрее, чем сельскохозяйственные культуры и в 1000-5000 раз быстрее, чем самые быстрорастущие породы животных);

– высокое содержание белка в биомассе (дрожжи способны накапливать до 40-50 % белка от своей массы, а некоторые бактерии до 60-70 % белка);

– удовлетворительная биологическая ценность белков – по содержанию большинства незаменимых аминокислот (лизин, треонин, триптофан и др.) белок многих дрожжей и бактерий соответствует эталону (таблица 1);

– независимость производства от погодных условий – биомассу микроорганизмов можно получать круглогодично;

– способность выращивания биомассы на различных непищевых субстратах и на отходах ряда производств;

– возможность организации крупнотоннажного производства.

Таблица 1 – Соотношение незаменимых аминокислот в микробном и стандартном (идеальном) белке, г/100г белка.

Аминокислота	Дрожжи	Бактерии	Водоросли	Грибы	«Идеальный» белок*
Лизин	6-8	6-7	5-10	3-7	4,2
Триптофан	1-1,5	1-1,4	0,3-2,1	1,4-2,0	1,4
Метионин	1-3	2-3	1,4-2,5	2-3	2,9
Треонин	4-6	4-5	3-6	3-6	2,8
Валин	5-7	4-6	5-7	5-7	4,2
Лейцин	6-9	5-11	6-10	6-9	4,8
Изолейцин	4-6	5-7	3,5-7,0	3-6	4,2
Фенилаланин	3-5	3-4	3-5	3-6	2,8

Для получения кормового белка можно использовать промышленное выращивание различных видов низших и высших грибов. В мицелии несовершенных грибов содержится: сырого протеина до 55-57%, истинного белка – 41-43%, нуклеиновых кислот – 5-6%. Состав мицелия базидиомицетов: сырой протеин – 42,5-48,5%, истинный белок – 24,3-30%, нуклеиновые кислоты – 2-4%.

Грибной белок хорошо усваивается. Степень усвояемости белка *Fusarium culmorum* составляет 84 %, а биологическая ценность по отношению к казеину – 50-70 %.

Одноклеточные водоросли являются перспективными источниками белка. Они легко отделяются от субстрата, медленнее растут, чем дрожжи, поэтому содержат меньше нуклеиновых кислот в биомассе. Общее содержание белка в водорослях может достигать до 70 % от массы.

В производстве кормовых продуктов рассматривают три основные формы использования микробного белка:

- цельная биомасса – без специального разрушения клеточных стенок;
- дезинтеграт – частично очищенная биомасса, полученная путем разрушения клеточных стенок и удаления нежелательных компонентов;
- изоляты – выделенные из биомассы белки.

Белковые дезинтеграты и изоляты называют белковыми препаратами. Дезинтеграты и изоляты отличаются по содержанию белка. Цельные клетки микроорганизмов в среднем содержат около 50 % белка, дезинтеграты клеток – около 70 %, изоляты – до 90 % и выше. Общие требования, предъявляемые к биомассе: отсутствие токсинов, тяжелых металлов и патогенных микроорганизмов, допустимое содержание канцерогенов.

*Микробный синтез белка.* Промышленное получение белка с использованием микроорганизмов обычно осуществляется в ферментаторах, работающих по принципу хемостата. В среду с размножающимся микроорганизмом непрерывно подают водный раствор минеральных солей и органический субстрат, конкретный для осуществляемого процесса. Культуру перемешивают, аэрируют и охлаждают.

Целесообразно использовать термотолерантные штаммы, что позволяет вести выращивание при максимально возможной температуре. С одной стороны, это снижает вероятность инфицирования, с другой – уменьшает затраты на охлаждение, так как расходы на эти цели тем ниже, чем больше разность

температур между охлаждающим агентом и средой. Схема получения микробного белка приведена на рисунке 4.

В качестве продуцентов микробного белка используют культуры дрожжей (*Candida*, *Endomycopsis*), несовершенных грибов (*Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*) и базидиомицетов (*Agaricus*, *Coprinus*, *Lentinus*, *Partus*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Russula*). Выбор продуцента определяется общим содержанием белка в биомассе, аминокислотным составом и усвояемостью белка, содержанием нежелательных компонентов [45].

Производство микробного белка представлено на рисунке 4.

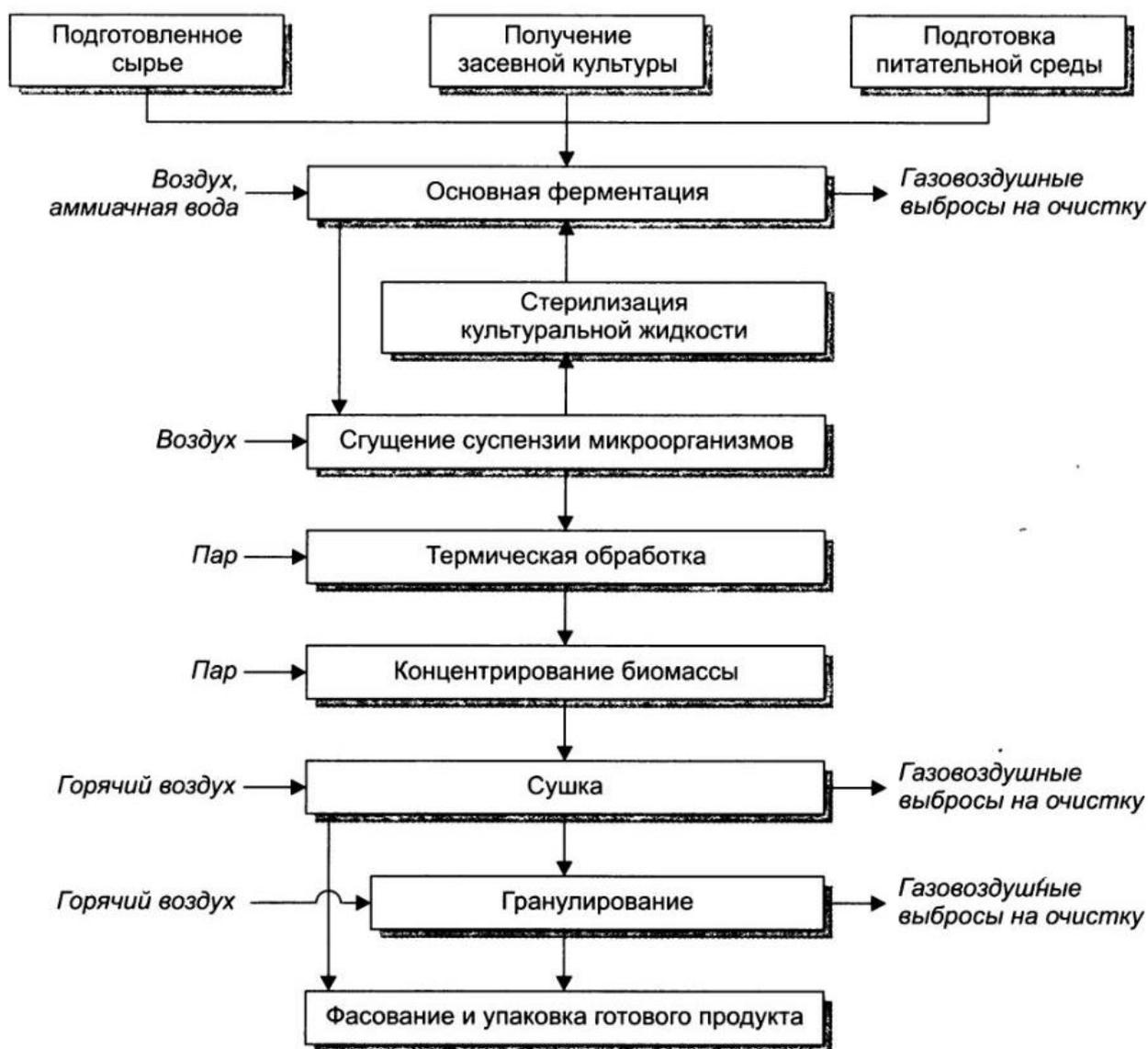


Рисунок 4 – Производство микробного белка (сухой биомассы)

Так, например, выращенные клетки дрожжей отделяют от водной среды сепарированием, а клетки грибов – фильтрацией. Термическую обработку проводят, как правило, при 80-90°C. Сметанообразную массу после отмирания клеток высушивают в распылительной сушилке, полученные хлопья или порошок гранулируют и упаковывают.

*Белковые препараты.* Материал клеточных стенок грибов содержит аллергены, антигенные факторы и ряд других нежелательных веществ, поэтому предпочтительно выделять белок из клеток. Это позволяет повысить усвояемость белка и расширить сферу его применения в пищевых производствах. Для получения дезинтегратов с различным фракционным составом и белковых изолятов из биомассы дрожжей используют автолиз и ферментативный лизис с помощью дрожжелитических ферментных препаратов и протеаз обычного типа.

*Обезвреженные корма.* Методы биоконверсии применяются также для снижения токсичности кормов. Токсичность может быть вызвана присутствием токсикогенных микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности, пестицидов, а также природных растительных токсинов, содержащихся в сырье.

Для обезвреживания продуктов используют способность микроорганизмов конкурентно подавлять развитие инородных форм, сорбировать и деградировать токсические соединения. В качестве микроорганизмов-детоксикантов часто используют дрожжи. Различные виды сахаромицетов (пекарские, пивные, винные дрожжи-киллеры) полностью обезвреживают среды, содержащие токсины *Cilrobacter* и *Hafnia alvei*. Эффективны как живые, так и автолизированные и мертвые дрожжевые клетки, что свидетельствует о сорбционном характере связывания токсинов.

Среды с комбикормами, зараженными токсигенными бактериями (*Aeromonas sp.*, *Cedaceasp.*, *Enterobacter cloacae*), практически полностью обезвреживаются при ферментации различных видов дрожжей в течение 48 ч. Лишь культуры *Ps. aeruginosa* не теряют токсигенности при совместном культивировании с дрожжами. Детоксикация зараженных сред сопровождается снижением антиоксидантной активности липидов токсигенных микроорганизмов.

Роль окислителей играют поверхностные структуры дрожжей. Детоксикация кормов проходит более успешно в глубинной культуре, что объясняется повышенной интенсивностью массообмена по сравнению с твердофазным процессом.

Дрожжи способны связывать токсины различной природы. Клеточные стенки дрожжей активно сорбируют пестициды фосфор- и хлорорганической природы (фосфамид, фозалон, кельтан).

Дрожжи – продуценты каротиноидных пигментов, которые способны деградировать афлатоксины. Активный деструктор афлатоксинов *Rhodotorula mucilaginosa* при выращивании на модельной среде разрушал афлатоксины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> и G<sub>2</sub> соответственно на 98,6; 68,6; 76,8 и 16,2 %.

Для снижения содержания природного растительного токсина госсипола в хлопковом шроте его ферментируют культурами микромицетов – мукоров и пенициллов. При этом достигается снижение концентрации свободного госсипола до 65 раз, связанного – до 88 раз. Микробная детоксикация позволяет использовать на корм скоту шрот после прямой экстракции масла, содержащий изначально свободный госсипол в концентрации выше допустимой (0,02 %) [44,7].

### **1.3 Инновации в производстве кормов**

А.Н. Трофимов, А.М. Белоусов в статье «Получение белково-углеводного корма на основе соломы» разработали технологию получения корма из соломы злаковых культур. Способ обработки соломы по предложенной технологии позволяет получать кормовой продукт улучшенной поедаемости с повышенной перевариваемостью питательных веществ по сравнению с необработанной соломой, обогащенной необходимыми для организма животного микро- и макроэлементами.

Сущность способа заключается в термохимической обработке соломенной резки щелочными реагентами с последующей нейтрализацией раствором соляной кислоты при температуре 95–100 °С в течение 3 ч. Полученный в результате

такой обработки гидролизат (жидкая фракция) содержит до 10–12% водорастворимых сахаров (в основном глюкозу), образующихся в результате гидролиза целлюлозного сырья, микро- и макроэлементы (Na, Ca, P и другие), в дальнейшем используемых в качестве питательной среды для дрожжевых микроорганизмов. Вырастив в этой питательной среде биомассу, смешиваем полученную дрожжевую суспензию с твердым остатком – обработанной соломой. В результате получается углеводно-белковый корм (УБК), предназначенный для жвачных животных [41].

В статье «Приготовление углеводно-белковых кормов посредством биоферментации вторичных растительных отходов АПК» В.С. Ромалийский поставил целью работы – разработку технологического процесса и технологической схемы функционирования биоферментатора для приготовления высокопитательных кормовых добавок из малоценного вторичного растительного сырья.

В результате исследований была обоснована технологическая схема и разработан технологический процесс функционирования технологической линии и биоферментатора для приготовления высокопитательных углеводно-белковых кормовых добавок из малоценных растительных отходов [27].

В своей статье «Использование отходов сельскохозяйственного производства для получения белково-углеводных кормовых добавок с разными функциональными свойствами» Н.Е. Павловская и др. изучали химический состав и биологическую ценность отходов сахарной промышленности (свекловичный жом), сельскохозяйственного производства (солома, гречиха) и производства сока (тыквенное сырье) для обоснования возможности их использования при получении белково-углеводных кормовых добавок с различными функциональными свойствами.

Методом биотестирования установлена токсикологическая безопасность полученных белково-углеводных кормов [22].

Е.В. Мельниковой в работе «Использование послеспиртовой барды в качестве сырья для получения высокобелковых кормовых препаратов» было

установлено, что из отходов спиртовой промышленности, а именно из дробины послеспиртовой барды, можно получить высококачественный кормовой продукт – биомассу дрожжей с содержанием белка не менее 50% и содержанием астаксантина 10мг/л. Такой кормовой продукт можно использовать в сельском хозяйстве в качестве полифункциональной кормовой добавки для балансировки содержания белка в корме с/х животных, птицы, рыбы и т.д. Дополнительное внесение в комбикорма астаксантина позволит сократить количество лекарственных средств, применяемых при выращивании животных и, следовательно, улучшить качество выпускаемой продукции [22].

Особенностью технологии, описанной В.В. Киреевой в работе «Технология комплексной переработки растительного сырья с получением пищевых белковых добавок», являлось использование низкотемпературной гидромеханической коагуляции белков клеточного сока из вегетативной массы растений в устройстве, преобразующем кинетическую энергию жидкости в тепловую. Проведенные исследования показали, что комплексная переработка вегетативной массы сельскохозяйственных культур обеспечивает получение из клеточного сока высококачественных пастообразных или сухих протеиновых концентратов кормового назначения, а из пресс-остатка силоса, травяной муки или продуктов микробной трансформации – съедобных грибов и обогащенного грибным мицелием корма [15].

Т.В. Щеколдина в статье «Технологии получения белоксодержащего сырья из продуктов переработки семян подсолнечника» анализировала методы извлечения белковых веществ из подсолнечного шрота и выбирала оптимальный способ. Наиболее распространенный метод - экстрагирование белков из измельченных и обезжиренных семян. Этот способ получения белкового концентрата в зависимости от типа обработки и вида промывного раствора удаляет из продуктов переработки масличных семян углеводы, минеральные соли и другие водорастворимые вещества. Сущность его заключается в измельчении очищенных семян, смешивании их с водой, кислотным или иным раствором для образования белковой дисперсии. Далее дисперсию разделяют, осаждая из

образовавшегося экстракта белковые вещества. Преимущество способа заключается в использовании не только масла семян, но и продуктов различных этапов их переработки. Классическая схема получения белкового изолята включает экстрагирование белков, последующее добавление кислоты для осаждения белка в изоэлектрической точке, центрифугирование, промывание и высушивание [47].

У Н.И. Кашеварова и В.П. Данилова в работе «Достижения и перспективы развития кормопроизводства в Западной Сибири» изучению перечисленных вопросов посвящена деятельность НИУ сибирского региона, занимающихся проблемами кормопроизводства. Сибирский НИИ кормов — региональный научный центр по этому направлению, который работает в координации со многими научно-исследовательскими учреждениями не только Сибири и Дальнего Востока, но и всей страны.

Была предложена и усовершенствована методика регенерации и культивирования растений нута из тканей зрелых зародышей и семядольных узлов.

Установлен оптимальный состав базовых сред для культивирования эксплантов ярового рапса. Выделены формы со светлой окраской оболочки семян.

В СибНИИ кормов разработана технология возделывания на семена диплоидного сорта клевера лугового Огонёк. Усовершенствована технология выращивания галеги восточной на семена в лесостепной зоне Западной Сибири.

Получены новые экспериментальные данные по вопросам основ биологизации севооборотов. В целом в севообороте с бобовыми культурами в сравнении с вариантом без них общий сбор кормовых единиц повышается на 59,3 %, а перевариваемого протеина — в 2,2 раза.

В СибНИИ кормов впервые был предложен способ приготовления силоса из многолетних бобовых трав, обеспечивающий получение высокопротеинового корма (14 % и выше).

Определены коэффициенты конверсии питательных веществ при кормлении жвачных животных. Предложен рецепт комбикорма на основе фуражного зерна после ферментативной полимеризации [14].

А.В. Тур, Ю.М. Епишкина и др. в своей работе «Полный факторный эксперимент комплексного гидролиза депротеинизированного подсолнечного шрота» определяли условия предварительного кислотного гидролиза депротеинизированного шрота подсолнечника (ДПШ) и проанализировали эффективность культивирования на полученных гидролизатах. ДПШ - ценное лигниноцеллюлозное вторичное сырьё, содержащее от 12,5-19,0% сырого протеина и 39-45% сырой клетчатки и практически не пригоден для использования в кормах в нативном виде. Основной проблемой переработки ДПШ является разрушение полисахаридов (целлюлоза, гемицеллюлоза), лигнина с высоким выходом редуцирующих веществ и побочным образованием антипитательных веществ для дальнейшего получения микробной биомассы.

По результатам своей работы авторы установили, провели оценку трех факторов pH гидролиза, время проведения гидролиза, температура процесса на следующие параметры: выход редуцирующих веществ, прирост биомассы, содержание сырого протеина в биомассе. На основании полученных данных они подобрали условия для проведения эксперимента второго порядка, с целью подбора оптимальных условий гидролиза депротеинизированного шрота для его использования в качестве компонента питательной среды для культивирования микроорганизмов и получения кормового белкового продукта [42].

П.С. Толоконин, Д.В. Баурин в своей статье «Пивная дробина: кислотный гидролиз и потенциал для биоконверсии» поставили цель – подбор условий кислотного гидролиза и оценка потенциала биоконверсии сухой пивной дробины путём проведения нулевого эксперимента.

В качестве объекта исследования была взята высушенная пивная дробина с содержанием влаги 8%. Количество сырого протеина, определенного по методу Кьельдаля составило 22%. В качестве микроорганизма были выбраны дрожжи

*Saccharomyces cerevisiae*, в связи с большим опытом их применения в качестве кормовой добавки.

В ходе работы было определено, что максимальный удельный выход биомассы достигается при концентрации пивной дробины 70 г/л и составляет 42,6 мкг дрожжей на 1 г исходной дробины, потребление субстрата при этом составило 54%. Низкая скорость роста микроорганизмов в эксперименте объясняется отсутствием минеральных солей и факторов роста [23].

## **2 Объекты и методы исследования**

### **2.1 Выделение и идентификация мицелиальных грибов из природных источников**

Сбор образцов навоза, птичьего и кроличьего помета проводился стерильным шпателем в стерильные полиэтиленовые пакеты в период его самонагревания до 50°C, когда происходило активное развитие представителей термофильных грибов, а рост мезофильных и термотолерантных грибов подавлялся.

Выделение грибов проводилось чашечным методом на твердых агаризованных средах с использованием метода прямого посева (метод Ваксмана), а также метода серийных разведений. Метод прямого посева подразумевает равномерное распределение кусочков исследуемого образца по поверхности твердой питательной среды в чашках Петри. При использовании метода серийных разведений брали навеску исследуемого образца 10 г, помещали в стерильную воду объемом 90 мл и тщательно встряхивали (разведение 1/10). Далее отбирали 10 мл из полученной суспензии и переносили в соответствующий объем стерильной воды и т.д., получая серию разведений (1/100, 1/1000 и т.д.). Посев на чашки Петри производили из суспензий с разведением 10-10<sup>3</sup>. Чашки с посевами инкубировали в термостате при температуре 42°C. Выбранный температурный режим позволяет исключить прорастание широко распространенных мезофильных грибов и способствует выделению представителей экологической группы термофильных микромицетов [23].

Для выявления наиболее полного видового состава термофильных грибов был использован ряд питательных сред следующего состава:

1. Агаризованное сусло: сусло - 800 мл, водопроводная вода - 200 мл, агар-агар - 16 г.

2. Среда Чапека:  $\text{NaNO}_3$  – 3 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5,  $\text{KCl}$  – 0.5,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.01, сахароза – 30, агар-агар – 16, дистиллированная вода – 1000 мл.

3. Глюкозно-дрожжевой экстракт: дрожжевой экстракт – 5 г, глюкоза – 10, агар-агар – 16, водопроводная вода – 1000 мл.

4. Крахмально-дрожжевой экстракт: порошкообразный дрожжевой экстракт – 4 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5, растворимый крахмал – 15, агар-агар – 16, вода (3/4 – водопроводной, 1/4 – дистиллированной) – 1000 мл.

5. Агар с бенгальским розовым: папайновый гидролизат соевой муки – 5 г, декстроза – 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5, бенгальский розовый – 0.05, агар-агар – 15, дистиллированная вода – 1000 мл, pH 7.2.

Все среды автоклавировались при температуре  $112^\circ\text{C}$  в течение 30 мин (0.5 атм). Перед разливом в чашки Петри в среды добавлялись антибиотики (0.5 г стрептомицина и 500000 ед. пенициллина) для подавления роста бактерий. Чашки Петри после посева субстратов помещались в термостат и инкубировались при  $42^\circ\text{C}$ . Для поддержания влажности на постоянном уровне на период инкубации в термостат помещался сосуд с дистиллированной водой. Начиная с 3 дня инкубации чашки просматривались визуально на предмет роста колоний грибов, которые по мере появления отсеивались в чистую культуру в заранее приготовленные пробирки со скошенным сусло-агаром.

Идентификация выделенных изолятов проводилась методом микроскопирования при увеличении  $\times 600$  и  $\times 800$  на основе морфолого-культуральных признаков с использованием общепринятых определителей и оригинальных статей [66,19,25]. Для микроскопирования были приготовлены временные препараты методом раздавленной капли. Для идентификации грибов, имеющих растворяющиеся структуры и цепочки конидий, препараты готовились на основе смеси спирта, глицерина и воды в соотношении 1:1:1. Уточнение таксономической принадлежности и филогенетического положения грибов

проводилось на основе изучения молекулярно-генетических признаков с использованием метода мультилокусного анализа (генов ITS, бета-тубулина) с использованием пар специфических праймеров:

(1) ITS1 - 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4 - 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3';

(2) Bt2a - 5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3' and Bt2b - 5'-ACCSTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3';

и последующим nBLAST-анализом полученных результатов в базе данных NCBI [25].

Для выделения геномной ДНК 0,5 г клеток культуры гриба разрушали жидким азотом и экстрагировали в 5 мл 4М гуанидина изотиоцианата и разделяли на 2 пробирки. В каждую пробирку добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1, перемешивали, центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин. К водной фазе добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (pH 5.2) и равный объем изопропанола (для осаждения). Осадок ДНК собирали центрифугированием в течение 10 мин при 13000 об/мин, несколько раз промывали 70% этанолом, затем один раз 96% этанолом (чтобы быстрее высушить), высушивали при комнатной температуре, либо в термостате при 37°C, и растворяли в 500-1000 мкл бидистиллированной воды.

Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 3.1 (9), используя для построения дерева методы ближайших соседей (Neighbor-joining, NJ) и максимальной экономии (maximum parsimony). Анализ повторной выборки Bootstrap применялся с 1000 повторов, чтобы присвоить доверительные пределы оценочным филогениям.

## **2.2 Скрининг штаммов мицелиальных грибов как продуцентов белка и целлюлаз**

Скрининг штаммов термофильных грибов с целлюлозолитической активностью проводили в два этапа. На первом этапе использовали качественный

(чашечный) метод, предусматривающий выращивание культур на агаризованных селективных питательных средах. Тестируемые грибы выращивали в чашках Петри в течение 4–7 сут на модифицированных средах Чапека-Докса, содержащих в качестве источника углерода и субстрата для ферментов натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ, 0,05–1,0%). В качестве индикаторов использовали конго красный (0,01–0,5 %, вводили в агаризованную среду), а также раствор Люголя. Культуры, синтезирующие целлюлазы, выявляли по способности формировать зоны просветления (изменения окраски) вокруг колоний, целлюлазную активность оценивали по величине соотношения диаметра зон просветления (d-зоны) и диаметра колоний (d-колонию).

На втором этапе проводили глубинное культивирование грибов для количественной оценки уровня продуцирования внеклеточных целлюлаз. Для этого отобранные штаммы грибов выращивали в пробирках со скошенным сусло-агаром в термостате при 42°C в течение 7–10 суток. В качестве посевного материала использовали 2–3 суточный мицелий грибов, выращенный на жидкой среде с суслон 4% по Баллингу, который вносили в количестве 5% по объему. Проверку способности грибов образовывать внеклеточные ферменты проверяли при выращивании на шести питательных средах:

– среда № 1 – Чапека-Докса (г/л): сахароза – 20,0; NaNO<sub>3</sub> – 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,5; KCl – 0,5; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,01; CaCO<sub>3</sub> – 0,3; дистиллированная вода – 1 л, pH исх. – 6,0–6,2;

– среда № 2 – минеральный фон среды Чапека-Докса в присутствии 5–10% кукурузного початка;

– среда № 3 – минеральный фон среды Чапека-Докса в присутствии 5–10% лузги риса;

– среда № 4 – минеральный фон среды Чапека-Докса в присутствии 5–10% рисовых отрубей;

– среда № 5 – минеральный фон среды Чапека-Докса в присутствии 5–10% опилок

– среда № 6 – минеральный фон среды Чапека-Докса в присутствии 5-10% соломы.

Все среды стерилизовались в автоклаве.

Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды на качалке (140 об/мин) в течение 4–7 сут. По окончании культивирования биомассу отделяли фильтрованием, фильтрат культуральной жидкости использовали для анализов. Для определения целлюлазной активности использовали колориметрический метод, основанный на определении восстанавливающих сахаров, образующихся при действии ферментов целлюлолитического комплекса на субстрат – Na-КМЦ. Реакцию гидролиза проводили при 40°C в течение 20 мин. За единицу активности принимали такое количество фермента, при действии которого на Na-КМЦ за минуту образуется 1 микромоль восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу. Для определения содержания восстанавливающих сахаров применяли 3,5-динитросалициловую кислоту. Количество белка оценивали методом Лоури [61]. Приведенные в работе результаты экспериментов представляют собой усредненные величины 3 опытов. При статистической обработке полученных данных использовали компьютерную программу Microsoft Excel.

Определение продуктивности штаммов проводили с использованием питательной среды, содержащей 5 г рисовой муки в качестве источника углерода и 45 мл дистиллированной воды. Культивирование проводили в 250-мл колбах без качания в термостате при температуре 22-45 °С, в зависимости от штамма. Определение прироста биомассы проводили через 4, 7 и 14 дней. Определение белка осуществляли методом Брэдфорда [50], а также методом Барнштейна [74]. Для этого биомассу гриба вместе с субстратом отделяли от супернатанта фильтрованием и подсушиванием фильтровальной бумагой, взвешивали, и растирали в ступке с жидким азотом до гомогенного состояния. Гомогенат заливали 8 М мочевиной, тщательно перемешивали и экстрагировали белки при температуре +14 °С в течение 12 час. Белковый экстракт отделяли от

нерастворенных компонентов центрифугированием при 11000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант использовали для определения белка по методу Брэдфорд с использованием бычьего сывороточного альбумина (Sigma), растворенного в 8-М мочеvine, в качестве стандарта.

### **2.3 Оптимизация условий культивирования штаммов мицелиальных грибов**

В качестве грибной культуры для обогащения растительных субстратов белком использованы штаммы грибов *Thermothelomyces thermophila* F-859 (ранее *Myceliophthora thermophila*), выделенного из рубца жвачных животных (Всероссийская Коллекция Микроорганизмов, ВКМ, [www.vkm.ru](http://www.vkm.ru)), и *Mycothermus thermophilus* 73 (6), отобранные в ходе скрининга термофильных грибов как наиболее активные и перспективные продуценты целлюлаз и мицелиального белка. Для приготовления сред брали наиболее перспективные растительные субстраты по приросту мицелиального белка и ферментативной активности целлюлаз у грибов в ответ на присутствие этих субстратов в питательной среде, а именно кукурузные початки, лужга риса и рисовые отруби. С целью дальнейшей оптимизации питательной среды были приготовлены среды следующего состава (для каждого вида растительного сырья) для штамма гриба *Th. thermophila*:

1. растительное сырье – водопроводная вода (в.в.);
2. растительное сырье – морская вода (м.в.);
3. растительное сырье – в.в. – соли;
4. растительное сырье – м.в. – соли;
5. сухое растительное сырье.

Культивирование гриба на средах проводили методом твердофазной ферментации. Растительный субстрат добавляли в количестве 10 г на одну колбу, вода – в объеме 10 мл на одну колбу. В качестве солей использовали  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (в концентрации 1 г/л) и  $\text{FeSO}_4$  (0.01 г/л). Перед посевом среды стерилизовали методом автоклавирования при 1 атм, 121°C в течение 15 мин.

Приготовленные среды засевали суспензией конидий гриба. Для приготовления суспензии конидий штамм гриба выращивали на скошенном сусло-агаре в течение 7 дней. Затем в пробирку с культурой приливали стерильный физиологический раствор, пробирку встряхивали. Полученной взвесью засевали колбы со средами. Инкубацию сред проводили при температуре 42°C.

Для штамма гриба *Mycothermus thermophilus* были выбраны в качестве растительного сырья доступные и дешевые виды сельскохозяйственных отходов: рисовая шелуха, рисовая мучка, дробленая кукуруза.

В лабораторных условиях культивирование гриба проводилось в колбах методом твердофазной ферментации, без предварительной химической обработки субстрата. Сухой субстрат добавляли в колбы в количестве 10 г. Перед посевом среды стерилизовались методом автоклавирования при 1 атм, 121°C в течение 15 мин. Приготовленные среды засевались суспензией с грибными конидиями. Для приготовления суспензии штамм гриба выращивали на скошенном агаризованном сусле в течение 7 дней. Затем в пробирку с культурой приливали стерильный физиологический раствор, пробирку встряхивали. Полученной взвесью засевались колбы со средами. Инкубацию сред проводили при температуре 42°C в течение 2-4 недель. Наилучшие результаты по содержанию белка показало культивирование гриба в течение 4 недель на рисовой мучке.

#### **2.4 Определение профиля ферментативной активности штаммов мицелиальных грибов**

Определение профиля внеклеточных ферментов и уровня их активности проводили после культивирования штаммов мицелиальных грибов в колбе объемом 250 см<sup>3</sup> без качания в течение 4 и 7 дней при температуре 45 °С, кроме морских штаммов, которые выращивали в тех же условиях при температуре 25 °С. Для культивирования штаммов использовали питательную среду, содержащую 5 г стерильной рисовой мучки, и 45 мл стерильной дистиллированной воды.

Для выделения ферментов клетки штаммов отделяли от культуральной среды фильтрацией и центрифугированием при 11000 об/мин. Супернатант использовали в качестве источника внеклеточных ферментов. Белки из супернатанта осаждали 80-%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , центрифугировали при 11000 об/мин в течение 30 мин при температуре 4 °С. Осадок перерастворяли в 2 мл 0,02 М  $\text{Na}^+$ -цитратного буфера, рН 5,4, диализовали против такого же буфера в течение 2 дней, затем центрифугировали при 11000 об/мин в течение 30 мин при 4 °С для удаления нерастворимых белков. Концентрацию белка и активность гликозидаз определяли в этом же буфере.

Определение активности гликозидаз проводили в микропланшете: 0,05 мл каждого образца и 0,10 мл раствора соответствующего п-нитрофенил-гликозида (Sigma) в концентрации 1 мг/мл в 0,02 М  $\text{Na}^+$ -цитратном буфере, рН 5,4, помещали в лунки микропланшета и инкубировали в течение 60 мин при 25 °С. Реакцию останавливали добавлением 0,15 мл 1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Раствор субстрата и раствор образца в том же буфере с таким же содержанием 1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  использовали в качестве двух контролей. Количество свободного п-нитрофенола определяли на спектрофотометре при длине волны 400 нм как разницу между значениями образца и контролей. За одну единицу активности принимали количество фермента, высвобождающее 1 наномоль паранитрофенола в час.

Определение активности полисахарид-гидролаз и –лиаз проводили в стеклянных пробирках: 0,05 мл каждого образца и 0,2 мл 0,1-% раствора соответствующего полисахарида в 0,02 М  $\text{Na}^+$ -цитратном буфере, рН 5,2, смешивали в стеклянной пробирке и инкубировали в течение 15 часов. Реакцию останавливали реагентом Нельсона. За одну единицу активности принимали количество восстанавливающих сахаров, высвобождающихся из субстрата, с использованием соответствующего моносахарида в качестве стандарта по методу Сомоги-Нельсона [62].

Удельную активность каждого фермента выражали в единицах на миллиграмм белка (ед./мг). Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд с использованием бычьего сывороточного альбумина (Sigma) в качестве стандарта.

п-Нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-галактопиранозиды, п-нитрофенил- $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкопиранозиды, п-нитрофенил- $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминид, п-нитрофенил- $\alpha$ -L-фукопиранозид, п-нитрофенил- $\alpha$ -D-маннопиранозид, п-нитрофенил- $\alpha$ -ксилозид (Sigma, USA) и п-нитрофенил- $\beta$ -N-ацетилглюкозаминид (Chemapol, Czech Republic) в концентрации 1,0 мг/мл использовали в качестве субстратов для соответственно  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидаз,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкозидаз,  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидаз,  $\alpha$ -фукозидаз,  $\alpha$ -маннозидаз,  $\alpha$ -ксилозидаз и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидаз.

Декстран, водорастворимый агар, амилозу, карбоксиметил целлюлозу (Sigma, USA), полигулуруоновую кислоту (British Drug Houses, United Kingdom), фукоиданы из бурой водоросли *Fucus evanescence* ( $\alpha$ -1,3;1,4-L-фукана сульфат), свободные от полифенолов и альгиновой кислоты [43], пустулан из лишайника *Umbilicaria rossica* ( $\beta$ -1,6-D-глюкан) [59], ламинаран из бурой водоросли *Laminaria cichorioides* (разветвленный  $\beta$ -1,3;1,6-D-глюкан), полиманнуруоновую кислоту из *Alaria fistulosa* ( $\beta$ -1,4-гликозид-связанная маннуруоновая кислота) [69] использовали в качестве субстратов для определения полисахарид-деградирующих ферментов.

## **2.5 Определение микотоксинов у штаммов мицелиальных грибов**

Наличие наиболее известных грибных микотоксинов в растительной биомассе, полученной после культивирования каждого штамма мицелиального гриба, проводили в сертифицированной лаборатории Инновационно-Технологического Центра ДВФУ (ИТЦ, ШЭМ, ДВФУ, г. Владивосток) с использованием тестов ELISA на содержание общего афлатоксина, афлатоксина В1, токсина Т-2, охратоксина А, фумонизина в соответствии с инструкцией производителя MaxSignal ELISA Test Kits (Bioo Scientific, USA ) [24].

## **2.6 Определение антибиотикочувствительности штаммов мицелиальных грибов**

Штамм мицелиального гриба выращивали на минимальной среде Вогеля (ММ) или картофельно-глюкозном агаре (PDA) в чашках Петри при 45 °С в течение 15 дней для сбора конидий. Чашки заливали 10 мл 0,05% Tween 80 и выдерживали в течение 15 мин. Конидии тщательно собирали с поверхности мицелия с помощью специальной 5-мл пипетки, а затем переносили в пробирку объемом 15 мл и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 2 мин для удаления мицелия. Супернатант сливали, оставшиеся в осадке конидии промывали ресуспендированием в 5 мл стерильной воды.

Смесь зрелых конидий в концентрации  $10^3$  была распределена на чашках со средой ММ, содержащей 2% сахарозы и различные концентрации антибиотиков: 1000, 1500, 2000 мкг/мл для канамицина; 1, 2, 5, 10, 12,5, 25, 50 мкг/мл для гигромицина, и 50, 100, 200 мкг / мл для фосфинотрицина. После инкубации в течение пяти дней при 22 °С для морских штаммов и 45 °С для наземных термофилов устойчивые к антибиотику колонии были видны на чашках.

## **2.7 Транскриптомный анализ штамма-производителя полисахарид-деградирующих ферментов, обеспечивающих полную конверсию растительных субстратов**

Штамм мицелиального гриба с наиболее широким спектром полисахарид-деградирующих ферментов и гликозидаз, позволяющих осуществлять полную конверсию растительного сырья в грибную биомассу, культивировали в 100-мл конической колбе с питательной смесью, содержащей 5 г стерильной рисовой муки и 45 мл стерильной дистиллированной воды, при температуре 45 °С в течение двух недель. Мицелий гриба помещали в ступку и растирали с жидким азотом. Затем биомассу заливали реагентом ExtractRNA (Евроген, Москва) для разрушения клеточных стенок и выделения суммарной РНК.

ExtractRNA – монофазный водный раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата, предназначенный для быстрого выделения суммарной РНК

высокого качества из широкого круга объектов: животные и растительные ткани, культуры клеток млекопитающих, бактерии, дрожжи.

Добавленный к образцу реагент моментально лизирует клетки, при этом целостность РНК сохраняется за счет высокоэффективного ингибирования активности РНКаз. Раствор после добавления хлороформа и центрифугирования разделяется на водную фазу, интерфазу и органическую фазу, при этом РНК, ДНК и белки оказываются в разных фазах.

Выделение суммарной РНК описано ниже.

Гомогенизация пробы. Гомогенизировали образец в растворе ExtractRNA. Инкубировали лизат при комнатной температуре в течение 10-15 мин, чтобы произошла полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов. Затем центрифугировали лизат при 11000 об/мин в течение 15 минут для удаления нерастворенных фрагментов. Супернатант осторожно отбирали в новую пробирку, чтобы не попал верхний жировой слой.

Разделение фаз. Добавляли 0.2 мл хлороформа на каждый 1 мл реагента ExtractRNA, добавленного на этапе гомогенизации. Далее закрывали пробирку, перемешивали содержимое пробирки с помощью встряхивания (вручную) в течение 15 секунд. Потом инкубировали смесь в течение 3-5 минут при комнатной температуре, периодически встряхивая образец. Центрифугировали образец при 11000 об/мин в течение 20 минут при 4°C. После этого аккуратно отобрали водную фазу и переместили ее в новую пробирку.

Выделение РНК. Добавляли в водную фазу 0.5 мл 100% изопропанола на каждый 1мл реагента, использованного для гомогенизации. Далее инкубировали смесь при комнатной температуре в течение 10 мин. Центрифугировали образец при 11000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре. Тщательно отобрали супернатант, оставив осадок РНК на дне пробирки. Затем аккуратно, по стенке пробирки, добавляли 2 мл 75% этанола на каждый 1 мл изопропанола, использованного в п.1. Образец центрифугировали на максимальной скорости в

течение 5 мин при комнатной температуре и сливали этанол. Повторяли это 2 раза. Высушивали осадок на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течении 5-7 мин. Затем растворяли РНК в необходимом объеме свободной от РНКаз воды и перемешивали [30].

Подготовка библиотек и секвенирование выполнено в ЦКП "Геномных исследований" ИЦиГ СО РАН, к.б.н., Васильевым Г.В. Сборка генов *de novo* выполнена к.б.н., Ощепковым Д.Ю.

Подготовка библиотек для секвенирования была выполнена с использованием набора TruSeq Stranded mRNA Library Prep производство Illumina.

Секвенирование транскриптов было выполнено на приборе NextSeq Illumina с использованием набора NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (75 cycles) производство Illumina.

Анализ секвенированных транскриптов (генов) проводили с использованием интерактивных баз и программ NCBI, в частности BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – средство поиска основного локального выравнивания).

### 3 Результаты и обсуждение исследования

#### 3.1 Результаты выделения и идентификации штаммов мицелиальных грибов

В результате работы в общей сложности из образцов навоза, кроличьего и птичьего помета было выделено и идентифицировано 12 видов термофильных мицелиальных грибов, принадлежащих к 10 родам (Таблица 2). Термофильные грибы представляют довольно малочисленную в таксономическом отношении, но распространенную в природе группу микроскопических грибов. Таксономическая принадлежность выделенных штаммов мицелиальных грибов представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Таксономическая принадлежность выделенных штаммов мицелиальных грибов и их плотность в изученных образцах

Таксон	Средняя плотность пропагул, КОЕ/г		
	Коровий навоз	Птичий помет	Кроличий помет
<i>Ascomycetes</i>			
<i>Emericella nidulans</i>	–	0.40	1.2
<i>Talaromyces dupontii</i>	3.34	–	–
<i>T. emersonii</i>	–	1.13	–
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	1.8	–	–
<i>Anamorphic fungi</i>			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	14.47	11.49	–
<i>Gilmaniella humicola</i>	4.07	2.33	–
<i>Mycothermus thermophilus</i>	5.73	0.16	6.3
<i>Malbranchea pulchella</i>	3.67	–	4.2
<i>Paecilomyces variotii</i>	5.6		–

Окончание таблицы 2

Таксон	Средняя плотность пропагул, КОЕ/г		
	Коровий навоз	Птичий помет	Кроличий помет
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	–	7.07	–
<i>Myceliophthora fergusii</i>	4.8	–	–
<i>Th. thermophila</i>	6.5	–	–

Практическое использование термофильных грибов в технологических процессах имеет преимущества перед мезофильными микроорганизмами. Многие виды аноксигенных термофильных грибов, обладая более высоким уровнем образования биомассы, являются перспективными продуцентами кормового источника белка, витаминов, липидов и других физиологически активных метаболитов. Кроме этого, термостабильные ферменты грибов этой группы имеют ряд преимуществ по сравнению с ферментами мезофильных грибов: их активность при повышенной температуре позволяет ускорить и модифицировать некоторые технологические процессы во многих отраслях промышленности [58].

Однако большая часть из 97 выделенных штаммов относилась к виду *A. fumigatus* (Таблица 2). Этот вид мезофильного гриба известен как патоген животных и человека, вызывающий аллергические реакции, микозы и микотоксикозы [37]. В наиболее частой форме взаимодействия гриба и организма вызывает бронхиальную астму и аллергический бронхолёгочный аспергиллёз (АБЛА). В связи с высокой степенью патогенности этот вид был исключен из дальнейшего скрининга штаммов грибов.

Для промышленного культивирования уже подобраны некоторые быстрорастущие штаммы грибов из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* [65]. Однако эти штаммы имеют недостатки, характерные для всех мезофильных грибов: усиленное спорообразование, быстрое осеменение болезнетворными микроорганизмами при наличии питательной среды из-за того,

что температурный режим, при котором они существуют и развиваются, является благоприятным для развития патогенной и условно-патогенной микобиоты. Многие мезофильные грибы являются продуцентами сильных микотоксинов. Кроме того, активность ферментов известных штаммов в оптимальном для них интервале температур является недостаточно высокой для обеспечения интенсивного процесса гидролиза.

Основными критериями в селекции штаммов грибов для производства обогащенных грубых кормов и различных растительных отходов являются атоксигенность, высокая скорость роста на субстрате, высокая белоктрансформирующая активность, высокое содержание белка с набором незаменимых аминокислот, степень безвредности при производстве обогащенного корма и его скармливании животным, стабильность и технологичность при изготовлении посевного материала культуры, проведение твердофазной ферментации [37]. Такими преимуществами перед мезофильными грибами могут обладать атоксигенные термофильные грибы. Поэтому далее поиск перспективных продуцентов белков и ферментов проводили среди штаммов термофильных мицелиальных грибов. Штамм гриба *Thermothelomyces thermophila* F-859 (ранее *Myceliophthora thermophila*), выделенный из рубца жвачных животных, приобретенный во Всероссийской Коллекции Микроорганизмов (ВКМ), использовался как наиболее изученный модельный организм среди термофильных микромицетов. Существуют данные по использованию и морских мицелиальных грибов для утилизации сельскохозяйственных отходов с целью получения биотоплива, ценных промышленных ферментов или кормовых добавок [44, 45].

Методы микроскопирования и молекулярной идентификации показали принадлежность выделенных в данной работе термофильных культур, отличающихся наибольшим приростом биомассы, к видам *Thermomyces thermophilus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium avenaceum*, *Mycothermus thermophilus*, *Thermothelomyces thermophila* (Рис. 5). Видовой состав микромицетов, выделенных из морского грунта Дальневосточных морей, и

показавших активный рост мицелия на рисовой мучке, произведенной в Приморском крае, вошли *Sirastachys phyllophila*, *Ochroconis mirabilis*, *Pseudallescheria boydii*, *Pseudallescheria ellipsoidea*, *Isaria felina*, *Thermothelomyces thermophila*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma* spp. (Рис. 5).

Высокий уровень гомологии выявили у объединенных нуклеотидных последовательностей маркеров таксономической идентификации ITS и бета-тубулина всех термофильных изолятов *Thermothelomyces thermophila* и *Mycothermus* spp. (Рис. 5). Морские изоляты *Scopulariopsis brevicaulis* и *Pseudallescheria* sp., выделенные из образцов грунта или воды, оказались с ними в одном кластере в филогенетическом дереве. Примечательно, что все грибные штаммы из морской среды, которые преимущественно росли при температуре 22-25 °С, кластеризовались вместе с наземными термофильными штаммами, за исключением морских изолятов *Trichoderma* sp. и *Sirastachys phyllophila* (Рис. 5).

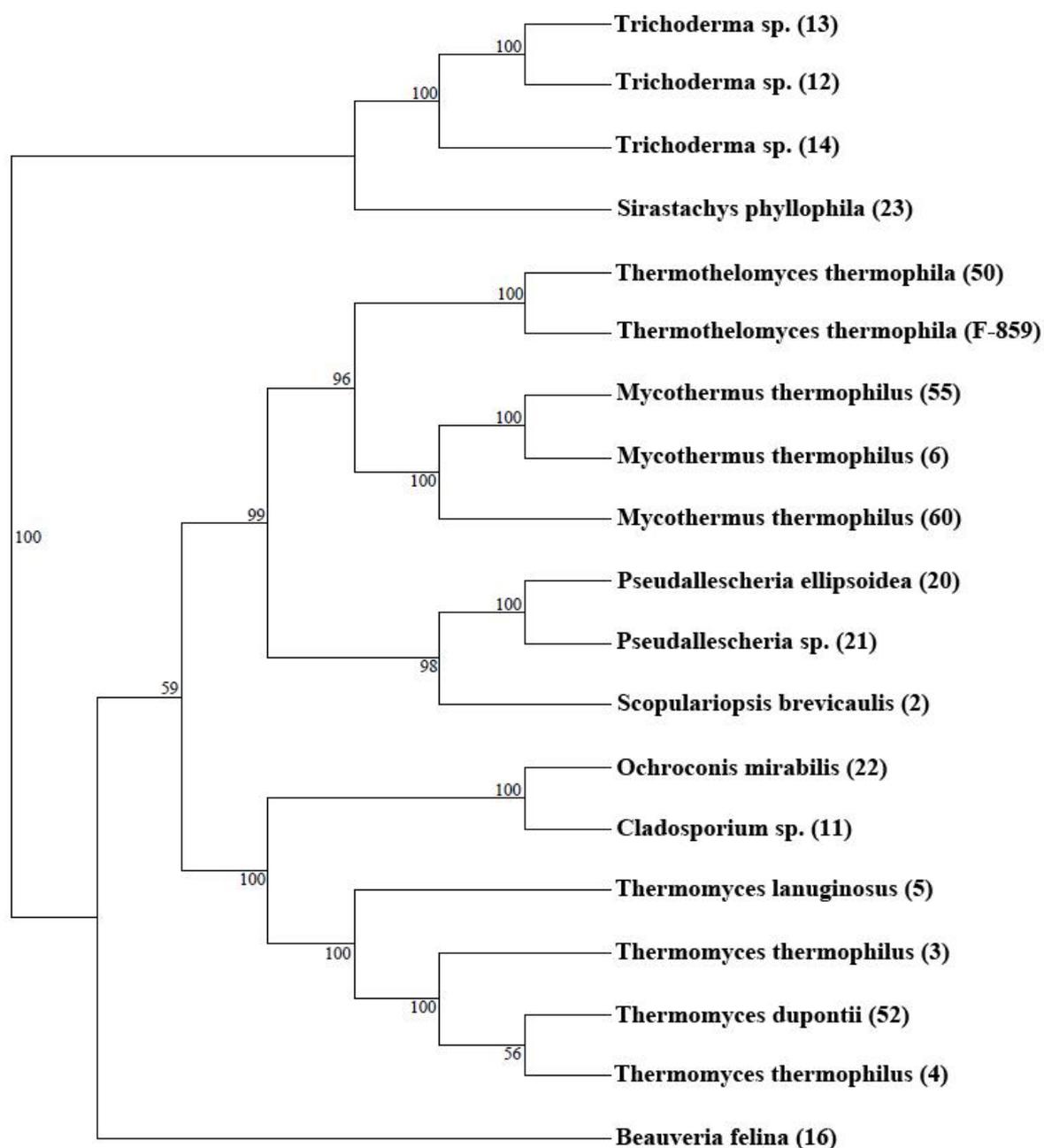


Рисунок 5 – Неукорененное филогенетическое дерево, построенное методом «ближайших соседей» (neighbor-joining phylogenetic tree) на основе объединенных нуклеотидных последовательностей ITS и бета-тубулина, демонстрирует филогенетическую связь между наземными термофильными и морскими штаммами грибов, отличающихся продуктивностью по биомассе и белку при выращивании на растительных субстратах. Номера штаммов микромицетов, указанные после видового названия, соответствуют номерам, депонированным в интерактивной базе данных GeneBank (ID PopSet: 1384036972 (TUB);1384036957 (ITS)). Значения Bootstrap-анализа указаны в точках разветвлений, отражающие вероятности филогенетического родства.

### 3.2 Результаты скрининга штаммов мицелиальных грибов как продуцентов белка и целлюлаз

Наличие целлюлозолитической активности у штаммов микромицетов является показателем их способности гидролизовать растительные субстраты. На первоначальном этапе скрининга штаммов грибов был использован экспресс-метод отбора микроорганизмов-продуцентов целлюлозолитических ферментов, основанный на формировании комплексов между полисахаридами и красителями. Согласно литературным данным, наиболее часто способность к деградации целлюлозы оценивают по способности микроорганизмов расти и формировать зоны просветления вокруг колоний на агаризованной минеральной среде с использованием субстрата КМЦ и хромогенного красителя конго красного [56]. В качестве индикатора используют также раствор Люголя [64]. При наличии у тестируемых микроорганизмов способности продуцировать целлюлозолитические ферменты, которые диффундируют в агар и гидролизуют Na-КМЦ, окрашенная агаризованная питательная среда вокруг выросших грибных колоний обесцвечивается. С помощью вышеуказанного экспресс-метода нами была проанализирована способность 63 грибных штаммов синтезировать целлюлозолитические ферменты. Наличие способности продуцировать целлюлазы выявлено у 28 штаммов, из которых 13 штаммов относилось к роду *Thermothelomyces*, 5 – к роду *Mycothermus*, 4 – *Malbranchea*, по 3 штамма – к родам *Gilmaniella* и *Thermomyces*. Отношения диаметров зон просветления и диаметров колоний составили: 1,02–1,30 (индикатор конго красный) и 1,01– 2,06 (окрашивание раствором Люголя в течение 5 мин). Наиболее активные штаммы отбирали по максимальным значениям отношения  $d_{\text{зоны}} / d_{\text{колонии}}$ , полученным для грибов, выросших на 2-х средах (Таблица 3).

Таблица 3 – Отобранные мицелиальные грибы – продуценты целлюлозолитических ферментов.

Культура	$d_{\text{зоны}} / d_{\text{колонии}}$ (индикатор Конго красный)	$d_{\text{зоны}} / d_{\text{колонии}}$ (индикатор раствор Люголя)
<i>Thermothelomyces thermophila</i>	1,30±0,05	2,06±0,06
<i>Myceliophthora fergusii</i>	1,24±0,04	1,36±0,05
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1,28±0,05	1,93±0,06
<i>Gilmaniella humicola</i>	1,24±0,03	1,45±0,04
<i>Mycothermus thermophilus</i>	1,29±0,05	2,01±0,06
<i>Malbranchea pulchella</i>	1,26±0,03	1,52±0,05

Выявленные наиболее активные штаммы-продуценты целлюлозолитических ферментов были использованы на втором этапе скрининга для проведения количественной оценки уровня продуцирования ими внеклеточных целлюлаз при глубинном культивировании. На данном этапе выявление активных целлюлозолитических изолятов мицелиальных грибов проводится с целью определения их способности к конверсии различных целлюлозосодержащих растительных субстратов для обогащения последних мицелием, содержащим белок и другие физиологически активные метаболиты. С этой целью был использован метод определения целлюлозолитической активности грибов на нерастворимых целлюлозных субстратах по их способности трансформировать эти субстраты в белок. В этом случае трансформирующая активность (ТАЦ) выражалась количеством белка на единицу внесенного субстрата. На основании полученных результатов проводился отбор активных целлюлозолитических штаммов по степени и характеру роста на субстрате, содержанию в культуральной среде растворимых продуктов его гидролиза, наличию и активности отдельных внеклеточных компонентов целлюлазного комплекса.

Первоначально установили, что все испытанные источники углерода способствовали росту грибов, однако накопление биомассы не всегда

сопровождалось синтезом исследуемых ферментов. Об интенсивности синтеза ферментов косвенно судили по количественному содержанию белка в культуральной жидкости. Для этого был подобран состав жидкой питательной среды. Исходная среда для глубинного культивирования отобранных штаммов имела солевой состав, аналогичный составу среды Чапека (среда №1). В среду также добавляли различные древесно-растительные компоненты (кукуруза, лузга риса, рисовые отруби, опилки, солома), выбранные на основе их доступности и дешевизны. Все среды, содержащие в качестве единственного источника углерода древесно-растительный материал, способствовали синтезу исследуемых ферментов. Отобранные для исследований культуры грибов имели различный уровень биосинтеза изучаемых ферментов на выбранных средах. Данные по продуцированию целлюлаз на разных средах отражены в таблице 4.

Таблица 4 – Образование целлюлозолитических ферментов отобранными грибами при глубинном культивировании

Культура	Целлюлаза, ед/мл					
	Среда № 1	Среда № 2	Среда № 3	Среда № 4	Среда № 5	Среда № 6
<i>Thermothelomyces thermophila</i>	0,53±0,03	0,47±0,02	0,53±0,03	0,62±0,03	0,48±0,01	0,46±0,04
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	0,41±0,01	0,44±0,01	0,47±0,02	0,45±0,01	0,47±0,01	0,39±0,01
<i>Mycothermus thermophilus</i>	0,40±0,01	0,46±0,01	0,49±0,02	0,39±0,01	0,38±0,01	0,37±0,02
<i>Myceliophthora fergusii</i>	0,28±0,03	0,22±0,03	0,20±0,01	0,21±0,02	0,19±0,01	0,17±0,01
<i>Gilmaniella humicola</i>	0,26±0,03	0,30±0,02	0,28±0,01	0,27±0,01	0,26±0,01	0,24±0,02

Максимальным уровнем продукции целлюлозолитических ферментов характеризовались *Th. thermophila*, *T. lanuginosus*, *M. thermophilus* и *G. humicola* – 0,40–0,62 ед/мл. Среда №4 (с добавлением рисовых отрубей в качестве единственного источника углерода) оказалась оптимальной для синтеза данных ферментов. Протокол исследований представлен в приложении А.

Рост и развитие микроорганизмов, а также образование ими ферментов находятся в тесной зависимости от состава питательной среды и условий культивирования, что было показано на примере отобранных нами штаммов *M. thermophila*, *T. lanuginosus*, *M. thermophilus* и *G. humicola*, выращенных на среде с добавлением различных древесно-растительных субстратов в качестве единственного источника углерода. Данные по содержанию белка отображены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 – Содержание белка в культуральной жидкости грибов *Th. thermophila*, *T. Lanuginosus*, *M. thermophilus* и *G. humicola*

Источник углерода, содержание в %	Белок, мг/мл			
	<i>Thermothelomyces thermophila</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Gilmaniella humicola</i>	<i>Mycothermus thermophilus</i>
Среда № 1	3,65	3,07	2,07	2,47
Среда № 2	2,75	2,94	1,91	1,08
Среда № 3	2,50	3,05	2,70	2,55
Среда № 4	3,7	3,01	2,95	3,54
Среда № 5	3,20	2,41	2,50	2,70
Среда № 6	3,60	3,21	2,97	2,58

Таблица 6 – Содержание белка в пересчете на сухое вещество в культуральной жидкости грибов *Th. thermophila*, *T. Lanuginosus*, *M. thermophilus* и *G. humicola*

Источник углерода, содержание в %	Белок, % в пересчете на сухое вещество				
	Фон в питательной среде	<i>Thermothelomyces thermophila</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Mycothermus thermophilus</i>	<i>Gilmaniella humicola</i>
Среда № 1	23,4	22,1	16,5	18,9	16,58
Среда № 2	29,3	27,2	23,5	25,6	22,5
Среда № 3	5,8	8,9	7,5	9,2	7,9
Среда № 4	13,5	19,9	19,2	16,3	19,3
Среда № 5	2,3	7,8	1,2	3,0	2,2
Среда № 6	1,2	1,2	0,9	2,7	1,7

Протоколы исследований представлены в приложении Б и приложении В соответственно.

Таким образом, в ходе двухэтапного скрининга продуцентов целлюлозолитических ферментов среди выделенных нами из природных субстратов штаммов термофильных грибов были отмечены штаммы, относящиеся к видам *Th. thermophila*, *T. lanuginosus*, *M. thermophilus* и *G. humicola*, как наиболее активные и перспективные продуценты целлюлаз и мицелиального белка. Отобранные штаммы могут быть использованы для дальнейших исследований, подбора и оптимизации сред с целью обогащения различных целлюлозосодержащих растительных субстратов в процессе кормопроизводства.

### 3.3 Результаты оптимизации условий культивирования штаммов мицелиальных грибов

Оптимизацию сред для культивирования штаммов термофильных мицелиальных грибов проводили на модельном микроорганизме *Th. thermophila* F-859. Данные по оптимизации сред представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Содержание белка в средах различного состава при культивировании штамма гриба *Th. thermophila* F-859

Среда	Массовая доля влаги	Массовая доля белка, %	Массовая доля белка на сухое вещество, %
1.Рисовые отруби+в.в.	71.4	5.5	3.49
2.Рисовые отруби+м.в.+соли	67.2	5.4	3.05
3.Рисовые отруби+м.в.	70.6	4.8	3.4
4.Сухие рисовые отруби	52.0	9.1	2.08
5.Рисовые отруби+в.в.+соли	70.9	5.8	3.43
6.Лузга риса+в.в.	56.0	0.8	2.27
7.Сухая лузга риса	52.9	0.95	2.12
8.Лузга риса+в.в.+соли	52.8	2.3	2.12
9. Лузга риса+мв.	53.2	1.02	2.14
10.Лузга риса+м.в.+соли	55.0	2.3	2.22
11.Кукуруза+м.в.	63.9	8.5	2.77
12.Кукуруза+в.в.+соли	60.3	10.8	2.52
13.Кукуруза+в.в.	61.5	9.9	2.59
14.Кукуруза+мв.+соли	58.9	5.7	2.43
15.Сухая кукуруза	31.6	2.1	1.46

Наиболее перспективными для прироста мицелиального белка оказались среды, приготовленные на основе рисовых отрубей с добавлением водопроводной воды и солей при рН близкой к нейтральной.

Таким образом, за основу питательного состава для мицелиальных грибов взяли рисовые отруби (рисовую мучку). При дальнейшей оптимизации питательной среды с использованием штаммов *Th. thermophila* F-859 и *M. thermophilus* 55 подобран оптимальный состав: рисовая мучка – 65%, рисовая шелуха – 5%, соевый шрот – 30% (5 г) и дистиллированная стерильная вода (45 мл), на котором наблюдался максимальный прирост мицелия у *M. thermophilus* 55, который составил 12,9 г за 14 дней. У всех штаммов, использованных в работе, включая штаммов *Th. thermophila* F-859, прирост мицелия при культивировании в тех же условиях не превышал 2-3 г. Результаты прироста белка штамма гриба *M. Thermophilus* 55 на различных средах представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты прироста белка при культивировании штамма гриба *M. Thermophilus* 55 на различных питательных средах

Среда	Количество белка, г
1. Смесь: рисовая мучка 65%, рисовая шелуха 5%, соевый шрот 30%*	12,9
2. Соевый шрот	5,1
3. Рисовая мучка	10,4
4. Рисовая шелуха	–
5. Картофельно-глюкозная среда	8,9
6. Ламинария	4,9
7. Ульва	5,1
8. Зостера	–

\*Питательная среда содержала 5 г субстрата и 45 мл дистиллированной стерильной воды.

### 3.4 Синтез полисахарид-деградирующих ферментов и гликозидаз у штаммов мицелиальных грибов

Помимо целлюлаз, как маркеров способности микроорганизмов усваивать трудногидролизуемые растительные субстраты, наиболее активные белоктрансформирующие микромицеты должны обладать целым спектром

других полисахарид-деградирующих ферментов, синтезирующихся в ответ на присутствие в питательной среде того или иного субстрата. При использовании микроорганизмов в качестве продуцентов полисахарид-деградирующих ферментов на трудногидролизуемых растительных субстратах, одновременно решаются две важные задачи – получение белковой массы для использования ее в обогащении животноводческих кормов, и утилизация отходов растениеводства, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, которые могут быть источниками загрязнения окружающей среды [20].

Важной задачей является поиск активных штаммов микроорганизмов, способных перерабатывать лигноцеллюлозосодержащие отходы, обладающие высокой устойчивостью к разложению микрофлорой. Мицелиальные грибы, культивируемые на целлюлозо- и лигнинсодержащих растительных отходах, вследствие их способности синтезировать комплекс гидролитических ферментов, разлагают целлюлозу и лигнин до простых веществ, из которых образуются аминокислоты и белки. Однако способность микромицетов усваивать полисахариды водорослей для биотехнологии получения экологического топлива или кормов являются особенно ценным качеством из-за их необычной структуры. Водоросли помимо целлюлозы и ксилана могут содержать ряд полисахаридов, не обнаруженных в наземных растениях, таких как альгинаты, фулканы/фукоиданы, ламинарины (в бурых водорослях), агар/агароза, каррагинаны (в красных водорослях), ульваны (в зеленых водорослях), многие из которых сульфатированы (Рис.6). Полимеры водорослей могут содержать мономеры фукозы и уроновых кислот. При получении биотоплива из водорослей такие полисахариды как альгинат, манит и фукоидан приходилось подвергать дополнительной обработке перед ферментацией [1, 5]. Поэтому скрининг активных продуцентов мицелиального белка и полисахарид-деградирующих ферментов впервые проводили и среди морских штаммов микромицетов.

Из исследуемых штаммов наибольший прирост грибной биомассы и мицелиального белка показали термофилы: 4 штамма *Mycothermus thermophilus* и 2 штамма *Thermomyces thermophilus*, что послужило основанием для определения

профиля их внеклеточных полисахарид-деградирующих ферментов (Табл. 9). Необычную специфичность, двукратный прирост биомассы (12,9 г сырого веса грибного мицелия) от исходной массы питательного субстрата (5 г рисовой мучки) и высокий уровень активности в отношении большинства исследованных полисахаридов водорослей проявил целлюлозолитический штамм из навоза *Mycothermus thermophilus* 55. Специфическая удельная активность ламинариназы (1,3-β-глюканазы) превышала на порядок уровень активности в морских штаммах и достигала 1180 ед./мг, так же как и уровень активности альгинат лиазы, каррагиназы, полиманнуронат лиазы, агаразы и фукоиданазы (от 208 до 500 ед./мг) превышал все значения в морских штаммах. При этом высокая деградирующая активность в отношении морских полисахаридов, так же, как и в отношении целлюлозы, амилозы и декстрана, развивалась у этого штамма на 7-ой день культивирования (Табл. 9). У морских штаммов наблюдалась противоположная картина – через 4 дня культивирования отмечался стабильный уровень активности всех полисахарид-деградирующих ферментов (25-37 ед./мг), однако через 7 дней эта активность уменьшалась практически до нуля, за исключением ламинариназы и полиманнуронат лиазы, активность которых возрастала с 30 до 600 ед./мг и с 30 до 280 ед./мг соответственно (Табл. 9).

Таблица 9 – Внеклеточные ферменты штаммов мицелиальных грибов, действующие на углеводы и углеводсодержащие соединения из растений и водорослей

Вид	<i>Beauveria felina</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>Thermothelomyces thermophila</i>	<i>Mycothermus thermophilus</i>			<i>Thermomyces thermophilus</i>		
Источник	морской грунт	морской грунт	(ВКМ)	навоз			навоз		
Штамм	34.3г.10	34.1г.4	F-859	55	60	73	52	3	4
Полисахарид-деградирующие ферменты (4 / 7 дней культивирования)*									
Агараза	25,6 / 0	2,5 / 0	8,6 / 8,9	1,3 / 301,7	0 / 0	1,2 / 0	0 / 66,2	0 / 0	0 / 0
Альгинат лиаза	30,8 / 0	9,8 / 2,3	9,2 / 0	2,3 / 208,2	2,3 / 10,5	5,0 / 0	0 / 53,1	0 / 0	0 / 0
Амилаза	18,8 / 0	13,4 / 31,5	5,4 / 18,3	0 / 407,5	0 / 11,6	0 / 13,91	0 / 83,8	0 / 22,7	0 / 6
Декстраназа	30,2 / 0	38,6 / 0	6,3 / 5,9	0 / 338,8	0 / 9,51	2,9 / 0	1,9 / 185,3	0 / 0	0 / 0
Каррагиназа	30,0 / 1	3,0 / 8,2	9,2 / 0	0 / 208,9	4,8 / 6,3	4,4 / 0	0 / 130,6	0 / 61,7	0 / 7,0
Целлюлаза	26,2 / 0	45,0 / 125,1	29,5 / 20,0	0 / 511,3	0 / 0	0 / 42,2	0 / 140,0	1,4 / 0	2,5 / 127,0
Ламинариназа	30,9 / 622,5	100 / 178,9	51,4 / 112,5	13,5 / 1180,0	1,0 / 39,8	75,8 / 93,6	9,6 / 758,2	9,6 / 538,5	16,5 / 650,5
Полиманнуронат лиаза	32,4 / 218,3	28,4 / 180,1	4,0 / 42,2	0 / 499,7	5,8 / 32,3	0 / 48,1	6,0 / 205,9	0 / 0	3,0 / 107,8

Окончание таблицы 9

Пустуланаза	37,2 / 1	0 / 0	2,3 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	2,3 / 160,9	0 / 2,3	0 / 19,0
Фукоиданаза	27,0 / 3	0 / 0	0 / 5,0	5,1 / 254,3	0 / 0	0 / 0	0 / 71,4	0 / 4,4	0 / 57,9
Гликозидазы (4 / 7 дней культивирования)*									
$\alpha$ -Галактозидаза	147,4 / 73,9	0 / 0	133,4 / 1033,2	0 / 0	1968,9 / 6534,9	3440,6 / 46457,6	457,1 / 308,4	0 / 21,8	134,5 / 325,9
$\alpha$ -Глюкозидаза	152,5 / 129,3	33,3 / 172,6	68,5 / 96,4	319,4 / 0	269,9 / 242,0	164,6 / 117,2	0 / 0,4	35,4 / 79,7	48,2 / 0
$\alpha$ -NAc- галактозаминидаза	0 / 124,7	0 / 109,3	0 / 374,1	89,7 / 0	62,9 / 0	60,4 / 246,2	0 / 0	8,1 / 0	0 / 0
$\alpha$ -Фукозидаза	122,0 / 78,5	0 / 51,8	0 / 555,8	134,5 / 0	142,4 / 0	54,0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
$\alpha$ -Маннозидаза	43,2 / 93,4	0 / 86,3	61,0 / 399,3	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
$\alpha$ -Ксилозидаза	162,7 / 0	0 / 0	55,6 / 856,5	0 / 0	212,0 / 0	63,0 / 0	0 / 0	11,2 / 0	32,4 / 0
$\beta$ -Галактозидаза	152,5 / 0	0 / 155,3	244,5 / 210,2	54,6 / 33,5	38,1 / 0	222,4 / 0	0 / 0,54	0 / 0	29,0 / 0
$\beta$ -Глюкозидаза	81,3 / 92,4	0 / 109,3	750,2 / 2107,3	657,1 / 4744,1	462,0 / 1357	2187,1 / 3437,0	89,0 / 742,6	378,6 / 1283,1	839,1 / 1236,8
$\beta$ -NAc- глюкозаминидаза	2267,1 / 1348,4	161,6 / 960,6	829,9 / 3236,7	987,8 / 695,9	76,2 / 252,0	673,7 / 595,5	0 / 123,9	39,8 / 173,0	50,5 / 0

В целом, высокий уровень ламинариказы с возрастанием значений активности на 7-ой день культивирования отмечен во всех без исключения образцах. Это не удивительно для морских грибов, так как ламинариказы и их субстраты широко распространены в морской среде (Рис. 6). Однако наличие 1,3- $\beta$ -глюканаз во всех грибах можно отнести к особенностям строения их клеточной стенки, в структуре которой часто встречаются 1,3- $\beta$ -глюканы [55].

Наряду с основными полисахарид-деградирующими ферментами у всех испытуемых грибных изолятов наблюдался широкий спектр гликозидазной специфичности (Табл. 9). Внеклеточные  $\beta$ -глюкозидазы и N-ацетил- $\beta$ -глюкозаминидазы синтезировались во всех образцах. Известно, что экспрессия  $\beta$ -глюкозидаз практически всегда сопутствует синтезу и деградирующему действию ламинариказ (Рис. 6). N-ацетил- $\beta$ -глюкозаминидазы входят в состав ферментов хитинлитического комплекса наряду с хитиназами. Однако N-ацетил- $\beta$ -глюкозаминидазы могут встречаться и отдельно от хитиназ, тогда их функция остается непонятной [9].

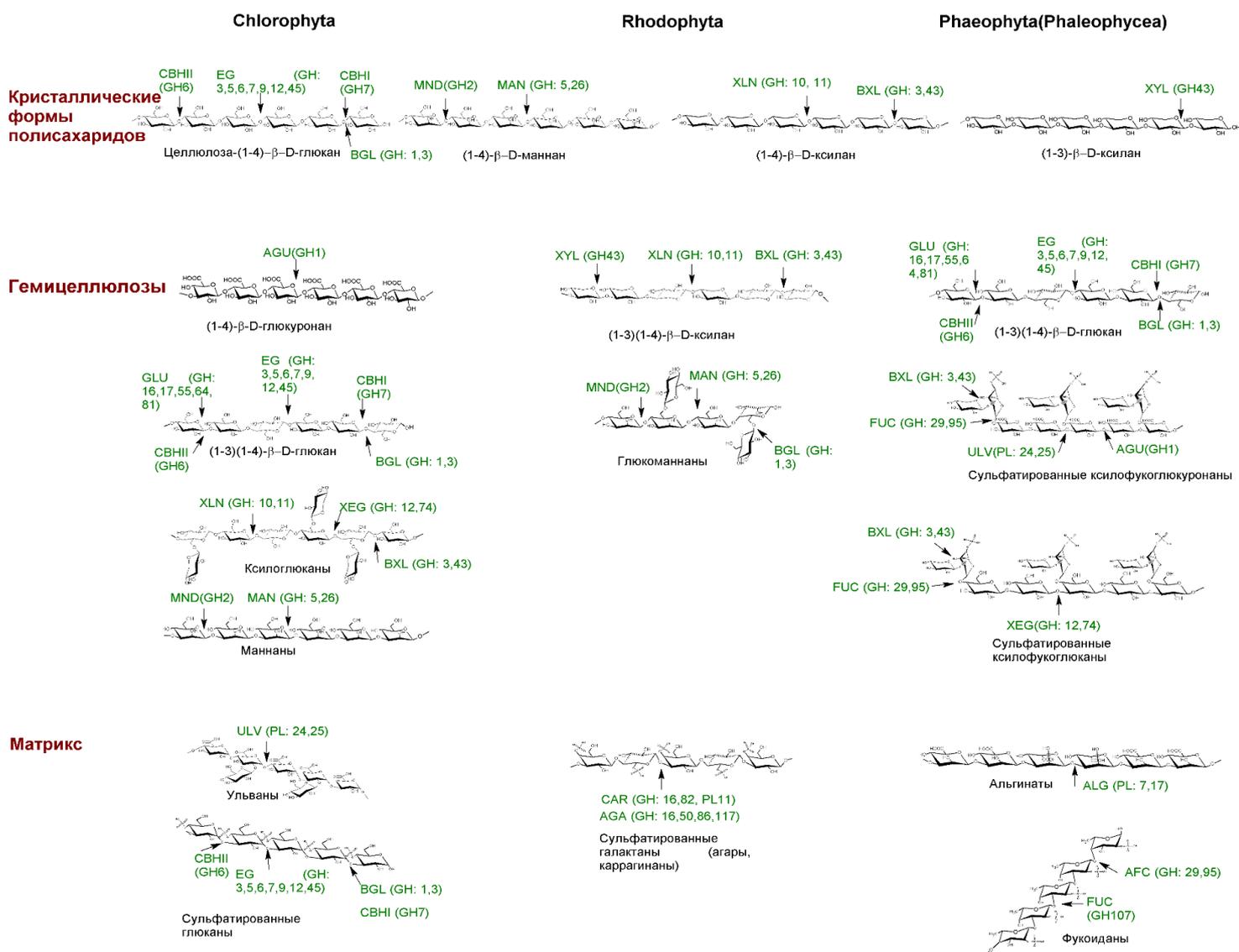


Рисунок 6 – Схематическое изображение полисахаридов клеточной стенки водорослей и соответствующих ферментов, разрушающих полисахарид. Сокращенные обозначения ферментов: AFC – α-фукозидаза, AGA - агараза, AGU - глюкуронидаза, ALG – альгинат лиаза, BGL - β-1,4-глюкозидаза, BXL - β-1,4-ксилозидаза, CAR - каррагиназа, СВНI- экзо-β-глюканаза (восстанавливающий конец), СВНII - экзо-β-глюканаза - целлобиогидролаза (невосстанавливающий конец), EG - эндо-β-1,4-глюканаза, FUC- фукоиданаза, GLU - β-1,4/1,3-глюканаза, MAN – эндо-β-1,4-маннаназа, MND- β-1,4-маннозидаза, ULV- ульваназа, XEG - ксилоглюкан-β-1,4-эндоглюканаза, XLN – эндо-β-1,4-ксиланаза, XYL - β-1,3-ксилозидаза. Сделай рисунок поменьше и подпись размести на одной странице с ним.

Практически во всех грибах, кроме *Mycothermus thermophilus* 55, отмечена невысокая амилолитическая активность (Табл. 9). Однако, несмотря на широкий профиль полисахарид-деградирующей активности, у штамма *Mycothermus thermophilus* 55 отсутствуют некоторые сопутствующие гликозидазы, такие как  $\alpha$ -галактозидаза,  $\alpha$ -маннозидаза,  $\alpha$ -ксилозидаза. Это может указывать на полисахарид-деградирующую, в частности целлюлозолитическую, специализацию этого штамма в природном сообществе. Способность штамма *Mycothermus thermophilus* 55, выделенного из коровьего навоза, расщеплять практически все полисахариды водорослей со столь высокой эффективностью (Табл. 9) требует дополнительного исследования его происхождения методами геномного и транскриптомного анализа, а также выделения и изучения свойств его ферментов, и их биологической роли в природе.

В остальных образцах микромицетов экспрессия  $\alpha$ -галактозидазы присутствовала, в особенности у штаммов *Mycothermus thermophilus* 60, 73 (6), *Thermomyces thermophilus* 4, 52 и *Thermothelomyces thermophila* F-859 (Табл. 9). Следует также отметить морских и двух наземных продуцентов редко встречающегося фермента - N-ацетил- $\beta$ ( $\alpha$ )-галактозаминидазы (Табл. 9), который у многих организмов ассоциируется с факторами вирулентности или патогенности, а также агрессивности против конкурирующих с ними микроорганизмами (у вирусов, бактерий, раковых клеток) [49].

Таким образом, все выявленные активные гемицеллюлозолитические штаммы термофильных наземных и морских грибов представляют интерес для использования их полисахарид-деградирующего потенциала как в конверсии различных растительных отходов сельского хозяйства и марикультуры, так и для модификации углеводсодержащих соединений в структурных исследованиях и биотехнологии.

### **3.5 Безопасность использования штаммов термофильных и морских мицелиальных грибов**

У всех грибных изолятов, использованных в работе и представленных в Таблице 9, которые были выбраны по высокому уровню производства грибной биомассы и синтеза широкого спектра полисахарид-деградирующих ферментов при культивировании на растительных отходах, известные микотоксины, такие как общий афлатоксин, афлатоксин В1, токсин Т-2, охратоксин А, фумонизин, либо не были выявлены, либо их уровень соответствовал предельно допустимой нормы. Во многих образцах наблюдалось уменьшение исходного уровня микотоксинов, определяемого в растительном сырье [2].

### **3.6 Антибиотикочувствительность штаммов мицелиальных грибов**

Несмотря на высокую производительность выбранных штаммов по продуцированию гидролитических ферментов и мицелиального белка, разработка универсальных генетических инструментов необходима для возможности их метаболической коррекции в случае использования в биотехнологии. Известно несколько генетических подходов для трансформации промышленного штамма С1 *Thermothelomyces thermophila* ATCC 42464, ранее известного как *Myceliophthora thermophila* С1. Высокоэффективная трансформация, опосредованная агробактериальной трансфекцией (*Agrobacterium tumefaciens*), позволила разрушить целевые гены в хромосоме гриба *M. thermophila* ATCC 42464 на основе применения бинарного вектора pPK2BarGFPD. Фосфинотрицин в концентрации 100 мкг/мл полностью ингибировал рост этого гриба, что послужило основанием для его использования в качестве селективного маркера трансформации. Гигромицин не оказывал заметного действия на культуру [57].

Однако одним из наиболее часто используемых селективных маркеров для грибов является ген устойчивости к гигромицину (hph). Термофильные грибные изоляты, выбранные по наибольшей эффективности деградации субстратов растений и водорослей, были тестированы на устойчивость к

различным концентрациям фосфинотрицина, гигромицина и канамицина для определения генетического маркера трансформационного события [68]. Результаты антибиотикочувствительности штаммов представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Антибиотикоустойчивость штаммов мицелиальных грибов

Вид	<i>Beauveria felina</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>Thermothelomyces thermophila</i>	<i>Mycothermus thermophilus</i>			<i>Thermomyces thermophilus</i>		
Источник	морской грунт	морской грунт	(ВКМ)	навоз			навоз		
Штамм	34.3г.10	34.1г.4	F-859	55	60	73	52	3	4
Канамицин, мкг/мл									
2000	-	+	+	-	-	-	+	+	+
1500	-	+	+	-	-	-	+	+	+
1000	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Гигромицин, мкг/мл									
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	+	+	+
10	-	-	-	+	-	-	+	+	+

Окончание таблицы 10

Вид	<i>Beauveria felina</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>Thermothelomyces thermophila</i>	<i>Mycothermus thermophilus</i>			<i>Thermomyces thermophilus</i>		
Источник	морской грунт	морской грунт	(ВКМ)	навоз			навоз		
Штамм	34.3г.10	34.1г.4	F-859	55	60	73	52	3	4
Гигромицин, мкг/мл									
5	+	+	+	+	-	-	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Фосфинотрицин, мкг/мл									
200	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Результаты скрининга показали, что штаммы *Mycothermus thermophilus* 55, 60 и 73 проявляли чувствительность к канамицину в концентрациях выше 1000 мкг/мл, а также все исследуемые изоляты показали высокую устойчивость к фосфинотрицину. Поэтому в качестве маркера трансформации рекомендовано использование гена гигромицин В фосфотрансферазы (hph) для разработки новой системы генетической трансформации. Гигромицин полностью ингибировал рост мицелия при концентрации 10 мкг/мл у большинства изолятов, и 25 мкг/мл у штаммов *M. thermophilus* 55 и *T. thermophilus*.

### **3.7 Транскриптомный анализ штамма-продуцента полисахарид-деградирующих ферментов, обеспечивающих полную конверсию растительных субстратов**

Анализ *de novo* секвенирования транскриптома *de novo* проводили у штамма *Mycothermus thermophilus* 55 как наиболее продуктивного по биомассе и ферментам с наиболее широким диапазоном полисахарид-деградирующей специфичности (Таблица 9). Прирост мицелия у данного штамма на среде, содержащей 5 г смеси рисовой муки, рисовой шелухи, и соевого шрота в 50 мл жидкой культуры был 12-13г сырого веса за 14 дней, по сравнению 2-3г мицелия у остальных штаммов, выращенных в тех же условиях. Интересно было понять, гены каких ферментов экспрессируются в ответ на присутствие трудногидролизуемых растительных компонентов среды.

Так, геномный анализ и экспериментальные данные по ферментативной активности двух термофильных грибов *Myceliophthora thermophila* и *Thielavia terrestris* свидетельствовали том, что оба термофила способны гидролизировать все основные полисахариды, обнаруженные в растительной биомассе [70]. Изучение данных транскриптома и секретируемых белков при выращивании на различных субстратах показали, что два гриба используют общие подходы при гидролизе целлюлозы и ксилана, но различные механизмы деградации пектина. Чтобы исследовать стратегию, используемую этими термофилами для разложения полисахаридов растительных клеточных стенок, использовали

РНК-Seq для сравнения профилей транскриптов во время роста на ячменной соломе, люцерны и глюкозе. Люцерна была выбрана для представления двудольных растений, тогда как ячмень использовался для выращивания однодольных растений. Основное различие между этими материалами заключалось в том, что углеводы из клеточной стенки ячменя в основном представляют собой целлюлозу и гемицеллюлозу со следовым количеством пектина, тогда как клеточная стенка люцерны содержит пектин и ксилан в примерно одинаковых пропорциях – 15-20% от общего количества углеводов. Заметные различия наблюдались между транскриптомными профилями генов, кодирующих разные классы углеводов-активных ферментов (Рисунок 7 а). Как и предполагалось, гены, кодирующие ферменты, используемые для модификации стенок грибных клеток (например, ферменты из семейств гликозид гидролаз GH16, GH17 и GH72), экспрессировались у двух организмов на одном уровне во время роста как на глюкозе, так и на растительной соломе. Напротив, транскрипты, кодирующие ферменты, которые разрушают полисахариды стенок растений, регулировались только во время роста на соломе ячменя или люцерны. Для роста на ячменной соломе индуцированные транскрипты тесно связаны с композицией субстрата; уровень экспрессии генов целлюлозолитических и ксиланолитических ферментов сильно повышался, за ними следовали гены для арабинаназ, маннаназы и, в меньшей степени, пектинолитических ферментов [70]. Однако такое простое сопоставление активности генов и составляющих субстрата не экстраполируется на данные при росте на соломе люцерны, особенно для *T. terrestris*. Несмотря на то, что по сравнению с ростом на глюкозе общая активность генов гемицеллюлозолитических ферментов повышалась, транскрипты, кодирующие ксиланолитические ферменты во время роста на соломе люцерны, сохранялись на относительно низком уровне у обоих организмов. Транскрипты, кодирующие пектиновые лиазы, преобладали у *M. thermophila* по сравнению с *T. terrestris*, что подчеркивает альтернативные стратегии, используемые этими двумя организмами для деградации пектина.

Вероятно, *T. terrestris* деградирует пектин, используя преимущественно гидролазную активность гликозид гидролазы из семейства GH28, тогда как *M. thermophila* использует преимущественно пектиновые лиазы. При выращивании на сложных субстратах несколько генов, кодирующих гидролитические ферменты из семейства GH61, сильно активируются в термофилах, особенно на ячменной соломе у штамма *M. thermophila*.

Грибы, которые разлагают растительную биомассу, как правило, обладают множественными генами для деградации одного полисахаридного полимера, и термофилы не являются исключением. Существует подмножество генов, кодирующих фермент и его изоформы, отвечающие той или иной ферментативной активности [70]. Более того, одно и то же подмножество генов активируется в разных условиях роста. Например, ортологи A, B, E, G и P гена фермента GH61 активируются у обоих термофилов при выращивании на сложных субстратах (Рисунок 7 б). Еще более яркая корреляция между уровнями транскриптов и количеством ортологов очевидна для целлюлаз из семейства GH6 и GH7, где профили транскрипции для ортологов двух организмов по существу идентичны, за исключением пектинолитических ферментов. Корреляция между профилями экспрессии и ортологами распространяется на многие белки, имеющие отношение к модификации лигноцеллюлозы.

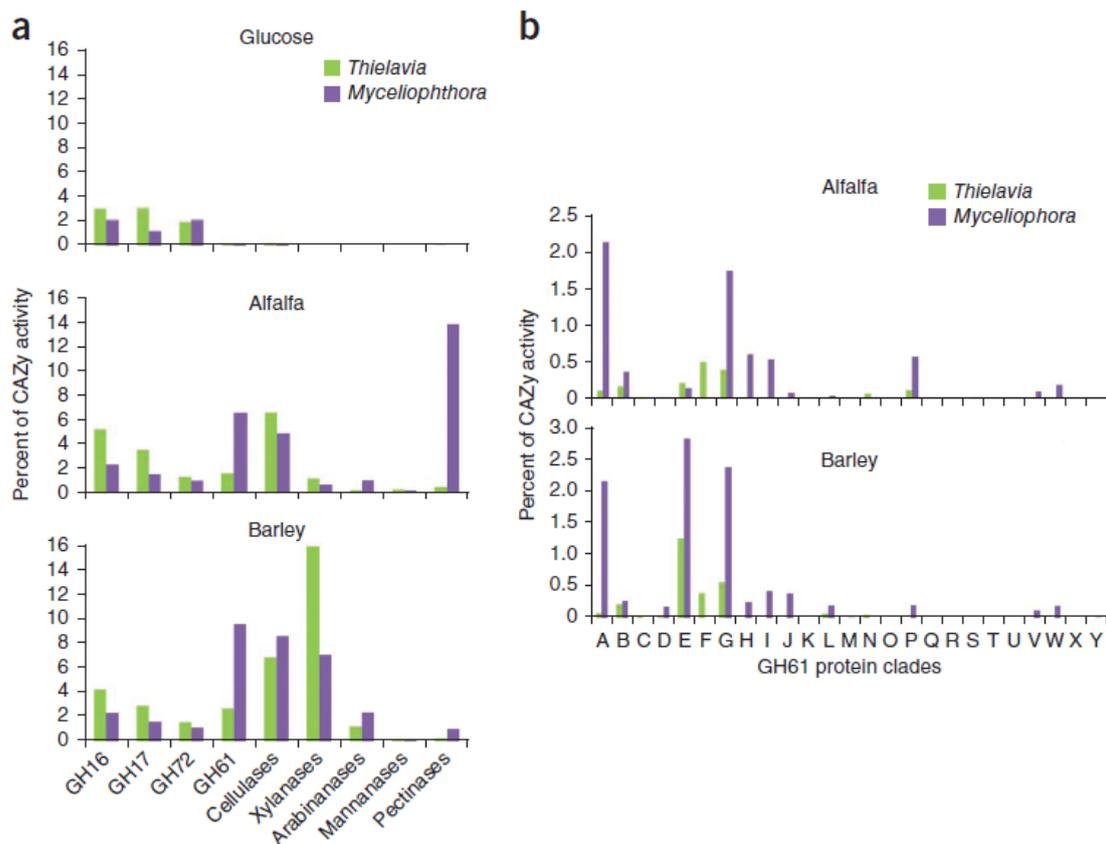


Рисунок 7 – Анализ транскриптомных профилей: а – экспрессия генов CAZymes термофилов, культивируемых на глюкозе, люцерне и соломе ячменя; б – транскриптомные профили GH61 ортологов в *M. Thermophila* и *T. Terrestris* [70].

Кроме того, термофилы *M. thermophila* и *T. terrestris* не только обладают разнообразными ферментативными активностями для деградации полисахаридов растительных клеточных стенок, но также разнообразными свойствами этих ферментов, которые обеспечивают эффективный гидролиз в диапазоне температур [70]. Термофильные грибы являются основными компонентами микрофлоры в самонагревающихся компостах. Они разрушают целлюлозу более быстрыми темпами, чем производители мезофильной целлюлазы, такие как *Trichoderma reesei* при 40-50 °С (Рисунок 8). Полисахарид-деградирующие ферменты термофильных грибов, разрушающие растительную биомассу, имеют оптимальную температуру между 55 и 70°С. Ферменты из термофилов выделяют значительно более высокие количества восстанавливающих сахаров, чем ферменты из мезофилов, с пиками при 40 °С

и 60 °С. Двухфазный температурный профиль разложения клеточной стенки предполагает, что белки, секретируемые термофилами, содержат несколько изоферментов биомассы, одни из которых имеют температурный оптимум при 60 °С, тогда как другие имеют оптимумы около 40 °С. Таким образом, разнообразие субстратной специфичности и термостабильных свойств ферментов термофилов может помочь объяснить вездесущность этих организмов в разлагающейся растительной биомассе при различных температурах.

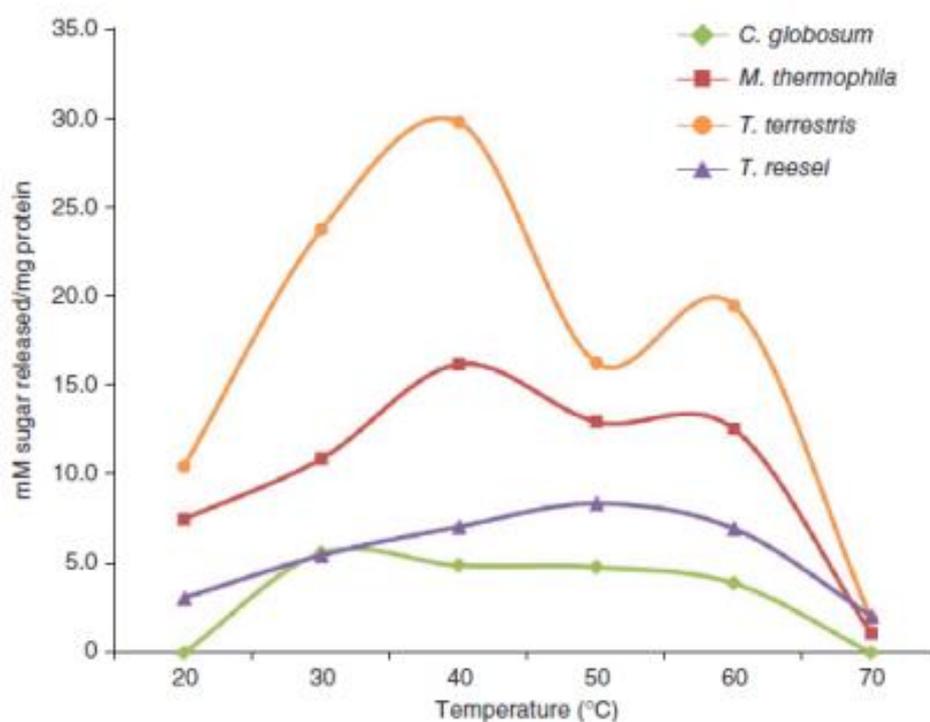


Рисунок 8 – Выделение восстанавливающих сахаров из люцерны внеклеточными ферментами из термофильных и нетермофильных грибов [70].

В данной работе при исследовании транскриптома термофильного штамма *Mycothermus thermophilus* 55 были обнаружены гены двух альфа-амилаз из семейства GH13, одна из которых имеет 80% идентичности с геном промышленного термофила *M. thermophila* ATCC 42464 (теперь *Thermothelomyces thermophila* ATCC 42464) [70], и 75% идентичности с геном

известного мезофильного микромицета *Neurospora crassa* OR74A, наиболее генетически изученного среди мицелиальных грибов [71]. Экспрессия амилазы в грибе вызвана наличием в культуральной среде большого количества крахмала, присутствующего в рисовой мучке (до 45% общего содержания). В аннотации транскриптома *de novo* транскриптома *Mycothermus thermophilus* 55 выявлено 32 альфа/бета глюкозидаз, из которых 6 ферментов относятся к эндо/экзо-1,3-бета-глюканазам, в основном из семейств GH55 и GH17, что объясняет столь высокую активность деградации ламинарина внеклеточными ферментами этого гриба (Таблица 9). Много генов 1,3-бета-глюканаз неизвестной структуры, что осложняет их идентификацию согласно общепринятой структурной классификации гликозид гидролаз для базы данных CAZy [72]. Обнаружены гены нескольких маннозил-олигосахарид глюкозидаз, что также соответствует данным ферментативного анализа, по результатам которого гриб проявляет высокую активность в отношении субстратов из водорослей, многие из которых имеют в своем составе маннозу и фукозу. Кроме того, в составе транскриптов *Mycothermus thermophilus* 55 присутствуют несколько генов глюкозидаз, которые могут быть ответственными за расщепление целлюлозы. Это могут быть как классические целлюлазы из семейств гликозид гидролаз GH1, GH3 (1,4-бета-глюканазы) с идентичностью 99-100% с генами известного целлюлозолитического штамма *Humicola insolens* Y1 [73], а также пока еще неизвестных глюкозидаз, дающих гомологию не более 40 % с глюкозидазами *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Oryza sativa*, *Th. termophila*, *Saccharomyces cerevisiae*. Такие белки требуют дополнительного изучения свойств для определения их классификации и биотехнологического потенциала.

Несколько генов эндо-1,4-бета-ксиланаз *Mycothermus thermophilus* 55, расщепляющие гемицеллюлозу растений, принадлежат к гликозид гидролазам семейств GH10 и 11, и имеют ближайшую гомологию 75%-80% с генами известных термофилов *Th. termophila* и *Humicola grisea* соответственно.

Имеются также сопутствующие ферменты – ксилозидазы/арабинидазы, которые отщепляют ксилозу в боковых ветвях основного полисахарида.

Таким образом, природу способности микромицета *Mycothermus thermophilus* 55 к глубокой конверсии трудногидролизуемых растительных субстратов можно объяснить наличием функционально активных генов всех необходимых для этого процесса ферментов. Однако остается неясным источник повышенной активности у почвенного гриба *Mycothermus thermophilus* 55 фукоиданазы, агаразы, альгинат лиазы и каррагиназы (Таблица 9). Эти ферменты пока еще мало изучены, поэтому идентификация генов, ответственных за функцию расщепления полисахаридов водорослей у наземного гриба, а также механизмы регулирования его экспрессии, представляется весьма перспективным как с эволюционной точки зрения, так и с точки зрения практического применения в новых технологиях.

## Заключение

Создание прочной кормовой базы – это не только увеличение производства и повышение качества кормов разных видов, но прежде всего внедрение высокоэффективных способов и средств их производства, приготовления, способствующих высокой усвояемости животными питательных веществ, содержащихся в кормах и обеспечивающих их рациональное использование.

В настоящее время есть огромный резерв неиспользуемых вторичных (побочных) продуктов – вторичного малоценного растительного сырья: это отходы зерноперерабатывающей, сахарной, пищевой и других отраслей АПК. При переработке основного растительного сырья используется от 20 до 50% этого сырья, остальное – отходы, малоценное растительное сырье.

Именно эти отходы можно использовать в кормовых целях. Одним из перспективных способов обработки растительного сырья является его микробиологическая биоконверсия. Поиск новых штаммов мицелиальных грибов, обеспечивающих глубокую конверсию растительного сырья, и исследование молекулярно-генетических механизмов этого процесса, обеспечит создание передовых технологий его переработки и использования в промышленности и сельском хозяйстве.

В ходе проделанной работы были исследованы пути оптимизации биоконверсии растительного сырья с помощью мицелиальных грибов для возможности их применения при получении белковых кормов в биотехнологии, для это были выполнены следующие задачи:

1. выделены и идентифицированы мицелиальные грибы из природных источников;
2. проведен скрининг штаммов мицелиальных грибов как продуцентов белка и целлюлаз;

3. выполнена оптимизация сред для культивирования перспективных штаммов мицелиальных грибов;

4. определен профиль полисахарид-деградирующей активности в отношении растительных и водорослевых субстратов;

5. определена антибиотикочувствительность штаммов для возможности их использования в модификации ферментного профиля и метаболома.

6. Проведен транскриптомный анализ штамма-продуцента полисахарид-деградирующих ферментов, обеспечивающих полную конверсию растительных субстратов.

**Результаты работы опубликованы в научных сборниках, а именно:**

П.К. Базюх Мониторинг сельскохозяйственного производства для биотехнологического получения белково-углеводных кормов на основе растительных отходов. // Новая экономика, бизнес и общество: сборник материалов апрельской научно-практической конференции молодых учёных ШЭМ (г. Владивосток, 28 апреля 2017 г.). – С. 948-953.

Базюх П.К., Ларионова А.А., Слепченко Л.В., Шкрыль Ю.Н., Югай Ю.А., Балабанова Л.А. Разработка векторной системы для эффективной генетической трансформации мицелиальных грибов как перспективных продуцентов белков. // Новое в технологии и технике функциональных продуктов питания на основе медико-биологических воззрений. Сборник статей VII Международной научно-технической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, профессора Зубченко А.В. (Воронеж, 13-15 июня 2018 года). – С. 317-321.

## Список использованных источников

1. Абайзов О.А. Ферментативный способ обработки соломы. – М.: Россельхозиздат, 1984. – 240 с.
2. Ахмадышин, Р.А. и др. Микотоксины – контаминанты кормов / Р.А. Ахмадышин и др. // Технология и аппараты пищевых производств – 2007 -№ 3. – С. 88-103.
3. Бабицкая, В.Г. Изучение условий глубинного культивирования мицелиальных грибов на соломе / В. Г. Бабицкая, И. В. Стахеев // Микология и фитопатология. – 1981. – Т. 15, вып. 1. С. 22-27.
4. Бабицкая, В.Г. и др. Изучение условий биотрансформации лигноцеллюлозных субстратов мицелиальными грибами в условиях твердофазной ферментации / В. Г. Бабицкая и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1986. – Т. 22 – № 4 – С. 531-539.
5. Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья / под редакцией В.В. Володина // Труды Коми науч. центра УрО РАН, №129 – Сыкт.: Сыктавк. ун-тет, 1992. – 72 с.
6. Биотехнология Кн. 5: Производство белковых веществ / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. / В. А. Быков, М. Н. Манаков, В. И. Панфилов и др. — М.: Высш. шк., 1987. — 142 с.
7. Богданов, Г.А. Кормление сельскохозяйственных животных. -М.: Агропромиздат. - 1990. – 624 с.
8. Бровенко Г.Н., Гусельникова Т.В. Химический состав гидролизатов древесины – субстрат для микробиологического синтеза белка. // Гидролиз. и лесохим. пром-сть. – 1993. – № 1.С. 6-10.
9. Бурцева, Ю.В., Сова, В.В., Пивкин, М.В., Анастюк, С.Д., Горбач, В.И., Звягинцева, Т.Н. «Распространение о-гликозилгидролаз в морских грибах Японского и Охотского морей // Прикл Биохим Микробиол. 2010. Т. 46. №. 6. – С. 700-708.

10. Варфоломеев, С. Д. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. – М. : Высш. шк., 1990. – 296 с.
11. Гельфанд, Е.Д. Технология комплексной переработки растительного сырья методом гидролиза: учеб. Пособие / Е.Д. Гельфанд – Л.: Ленингр. лесохим. акад. им. С.М. Кирова, 1978. – 80 с.
12. Жуков, Н.А. Теоретические основы и технологические принципы непрерывной конверсии растительного сырья. Автореф. дис.... д-ра техн. наук: 03.00.23 / Н.А. Жуков – Киров, 2001. – 254 с.
13. Ибрагимова С.А. и др. Морфологические и физиологические особенности гриба при культивировании с целью получения кормового белка // «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий»: сб. материалов научно-техн. конф. – Саранск, 2001. – 85 с.
14. Кашеваров, Н.И., Данилов, В.П. Достижения и перспективы развития кормопроизводства в Западной Сибири // Достижения науки и техники АПК №1 – 2006г. – С. 19-22.
15. Киреева, В.В. Технология комплексной переработки растительного сырья с получением пищевых белковых добавок / В.В. Киреева // Известия вузов. Пищевая технология, № 5-6, 2004 г. – С. 50-51.
16. Корольков, И.И. Перколяционный гидролиз растительного сырья – М.: Лесн. пром-сть, 1990. – 272 с.
17. Костенко В.Г., Костенко Л.Д. Загрязняющие вещества в продуктах, полупродуктах и отработанных средах гидролизного производства. Обзор/ Минмедбиопром. – М., 1990. – Вып. 4. – 27 с.
18. Легеза, В.Н. Животноводство: учеб. Для начин. Проф. Образования. – М.: ИРПО; ПрофОбрИздат, 2001. – 384 с.
19. Литвинов М.А. Определитель микроскопических почвенных грибов. Л.: Наука. 1967. – 303 с.

20. Лобанок, А.Г., Бабицкая, В.Г., Богдановская, Ж.Н. Микробный синтез на основе целлюлозы: Белок и другие ценные продукты. Мн.: Наука и техника. 1988. – 261 с.
21. Манаков М.Н., Победимский Д.Г Теоретические основы технологии микобиологических производств. – М.: ВО АГРОПРОМИЗДАТ, 1990. – 272 с.
22. Мельникова, Е.В. Использование послеспиртовой барды в качестве сырья для получения высокобелковых кормовых препаратов / Е.В. Мельникова // Известия МГТУ «МАМИ» № 2(14), 2012, т. 4. – С. 101-105.
23. Методы экспериментальной микологии / под ред. В.И. Билай. Киев: Наукова думка. 1982. 549 с.
24. MaxSignal ELISA Test Kits [Электронный ресурс] – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.biooscientific.com/>.
25. Национальный центр биотехнологической информации [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
26. Немировская В.Д. и др. Содержание вредных примесей в гидролизных средах// Гидролиз. и лесохим. пром-сть. – 1988. – № 4. С. 21-22.
27. Павловская, Н.Е. Использование отходов сельскохозяйственного производства для получения белково-углеводных кормовых добавок с разными функциональными свойствами / Н.Е. Павловская // Вестник ОрелГАУ 6'(10). – С. 109-110.
28. Панфилов, В. И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дисс. ... д-ра техн. наук : 03.00.23 / Панфилов Виктор Иванович. – М., 2004. – 359 с.
29. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. Пер. с англ. Петровой Т.А., Позмоговой И.Н.; Ред. Работнова И.Л. - М.: Мир, 1978. – 330 с.
30. Реагент для выделения суммарной РНК из биологических образцов. Номер по каталогу ВС032. Инструкция по применению. [Электронный ресурс].

– Электрон. дан. – Режим доступа: <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/extractRNA.pdf>.

31. Ржаников Н.Н., Сушкова В.И., Солодянкина Л.А., Новик А.И. Интенсификация процесса гидролиза // Гидролиз. и лесохим. пром-сть. – 1988. – №1. С. 34-37.

32. Ромалийский, В.С. Приготовление углеводно-белковых кормов посредством биоферментации вторичных растительных отходов АПК / В.С. Ромалийский // Инновации в сельском хозяйстве. – 2016. № 4(19) – С. 208-217.

33. Рухман А.А. Мощное ультразвуковое оборудование// Сб. материалов «Ультразвуковые технологические процессы». – М., 1998. С. 193-196.

34. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб./ В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева и др.; Под ред. В.С. Шевелухи. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. шк., 2008. — 710 с.

35. Сергеев, А.Ю., Сергеев, Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. 2 изд. М.: Издательство БИНОМ. 2008. – 480 с.

36. Сеницын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. – М.: Московский университет, 1995. – 224 с.

37. Смирнов К.А., Ю.Д. Алашкевич, Н.С. Решетова. Особенности твердофазной ферментации. Химия растительного сырья. 2009. №3. – С. 161–164.

38. Сушкова В.И., Баранова А.В. Исследование оптимальных параметров процесса сернокислотного гидролиза некондиционного зерна// Химическая технология. – 2004. - №1. С. 23-27.

39. Технология биоконверсии растительного сырья. Ч. II. Перспективные технологии микробиологической конверсии растительной биомассы / П. В. Ми-ронов [и др.]. – Красноярск : СибГТУ, 2002. – 159 с.

40. Толоконин, П.С., Баурин, Д.В. Пивная дробина: кислотный гидролиз и потенциал для биоконверсии // Успехи в химии и химической технологии. ТОМ XXXI. 2017. № 9. – С. 26-28.

41. Трофимов, А.Н., Белоусов, А.М. Получение белково-углеводного корма на основе соломы // Химия растительного сырья. 2003. №4. – С. 69-72.
42. Тур, А.В., Епишкина, Ю.М. и др. Полный факторный эксперимент комплексного гидролиза депротеинизированного подсолнечного шрота // Успехи в химии и химической технологии. ТОМ XXXI. 2017. № 9. – С 29-31.
43. Урванцева, А.М., Бакунина, И.Ю., Ким, Н.Ю., Исаков, В.В., Глазунов, В.П., Звягинцева, Т.Н. // Химия растит сырья. 2004. Т. № 3. – С. 15-24.
44. Фаритов, Т. А. Корма и кормовые добавки для животных: Учебное пособие / Т. А. Фаритов. – СПб.: Лань, 2010. – 304 с.
45. Фицев, А. И. Проблемы и перспективы производства кормового бел-ка в России / А. И. Фицев // Кормопроизводство. – 2003. – №10. С.25-31.
46. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств. – М.: Лесн. пром-сть, 1989. – 496 с.
47. Щеколдина, Т.В. Технологии получения белоксодержащего сырья из продуктов переработки семян подсолнечника / Т.В. Щеколдина // Научный журнал КубГАУ, №109(05), 2015 г. – С. 1-19.
48. Эрнст Л.К., Науменко З.М., Ладинская С.И. Кормовые продукты из отходов леса. – М.: Лесн. пром-сть, 1982. – 168 с.
49. Bakunina, I., Nedashkovskaya, O., Balabanova, L., Zvyagintseva, T., Rasskasov, V., Mikhailov, V. // Mar Drugs. 2013. V. 11. №. 6. – P. 1977-1998.
50. Bredford, M.M. // Anal Biochem. 1976. V. 72. №. 1–2. – P. 248–254.
51. Carmichael J.W. 1962. Chrysosporium and some other aleuriosporic hyphomycetes. Can. J. Bot. 40. – P. 1137-1175.
52. Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. Int J Biol Sci 2009 – P. 578-595.
53. Deshmukh, S. K., Prakash, V., Ranjan, N. (2017). Marine Fungi: A source of potential anticancer compounds. Front. Microbiol., 05 January 2018 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02536>.

54. Doelle, H.W. // *Biotechnol. Adv.* 1984. V. 2. № 1. – P. 1 – 19.
55. Douglas, C.M. // *Med Mycol.* 2001. V. 39. №. – P. 55-66.
56. Ellis M.B. *Dematiaceous hyphomycetes.* CMI, Kew. 1971. – 608 p.
57. Jing Xu, Jingen Li, Liangcai Lin, Qian Liu, Wenliang Sun, Bangquan Huang and Chaoguang Tian. Development of genetic tools for *Myceliophthora thermophila* // *BMC Biotechnology* 2015. – P. 1-10.
58. Karnaouri, A., Topakas, E., Antonopoulou, I., Christakopoulos, P. // *Front Microbiol.* 2014. V. № 5. – P. 281.
59. Kusaykin, M.I., Bakunina, I.Y., Sova, V.V., Ermakova, S.P., Kuznetsova, T.S., Besednova, N.N., Zaporozhets, T.S., Zvyagintseva, T.N. *J Biotechnol.* 2008. V. 3. №. – P. 904–915.
60. Lio, J. Y., Wang, T. (2012). Solid-state fermentation of soybean and corn processing coproducts for potential feed improvement. *J. Agric. Food Chem* 60. – P. 7702–7709.
61. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. №1. – P. 265-275.
62. Nelson, T.E. // *J Biol Chem.* 1944. V. 153. №. – P. 375–381.
63. Nolwenn Hymery Valérie Vasseur Monika Coton Jérôme Mounier Jean-Luc Jany Georges Barbier Emmanuel Coton *Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014. – P. 437-456.
64. Samson R.A. 1974. *Paecilomyces and some allied hyphomycetes.* *Studies in mycology.* Baarn 6. – 119 p.
65. Saleh, A.M., Nevin, M.F., Ebtsam, N.H. // *J Biotechnol.* 2006. V. № 127. – P. 54-64.
66. Thom C., K.B. Raper. *A manual of the Aspergilli.* U.S.A. 1945. – 373 p.
67. Tonozuka, T., Yoshida, M., Takeuchi, M. *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems.* Waltham: Academic Press. 2014. – P. 225-242.

68. Tzvi Tzfira, Guo-Wei Tian, Benoît Lacroix, Shachi Vyas, Jianxiong Li, Yael Leitner-Dagan, Alexander Krichevsky, Tamir Taylor, Alexander Vainstein and Vitaly Citovsky. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. // *Plant Molecular Biology* (2005) 57. – P. 503-516.
69. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L. // *J Exp Mar Biol Ecol.* 2005. V. 320. № 2. – P. 123–131.
70. Randy M Berka, Igor V Grigoriev, Asaf Salamov, Ian D Reid. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris* // *Nature biotechnology* 2011. V.29. № 10. – P. 922-929.
71. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *JOURNAL Nature* 422 (6934), 859-868 (2003).
72. Naumoff, D.G. Development of a hierarchical classification of the timber barrel type glycoside hydrolases // *Proceedings of the Fifth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure.* 2006, 1, 294—298.
73. Xia,W., Bai,Y., Cui,Y., Xu,X., Qian,L., Shi,P., Zhang,W., Luo,H., Zhan,X. and Yao,B. TITLE Functional diversity of family 3 beta-glucosidases from thermophilic cellulolytic fungus *Humicola insolens* Y1 *JOURNAL Sci Rep* 6, 27062 (2016).
74. Barnshtein method // *Anal Biochem.* 1978. V. 72. №. 1–2. – P. 248–254.

## Приложение А

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования

**«Дальневосточный федеральный университет» (ДВФУ)**

Юр. адрес: 690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8  
Инновационный технологический центр Тел.: (423) 240-34-39, факс: (423) 240-66-37  
e-mail: [lsvk\\_etc@mail.ru](mailto:lsvk_etc@mail.ru)

### ПРОТОКОЛ №5

#### Определение активности целлюлаз термофильных штаммов сапрофитных грибов

1. Наименование лаборатории: Лабораторный комплекс Инновационного технологического центра Школы экономики и менеджмента ДВФУ
2. Зав. лабораториями Кожедуб И.А. Жезлова С.В.
3. Исполнитель Балабанова Л.А. Подволоцкая А.Б
4. Наименование метода Определение целлюлазной активности
5. Условия проведения испытаний:

#### Оборудование

№	Наименование СИ, тип (марка)	Год ввода в эксплуатацию, инв. номер	Свидетельство о поверке СИ или сертификат о калибровке СИ (номер, дата, срок действия)
А.	Термометр стеклянный типа ТС-7АМ, зав. № 178	2008г. Без ин.№	Поверка от 4 кв.2014г. 2 года
В.	Термометр стеклянный типа ТС-7АМ, зав. № 00778	2014г. Без ин.№	Поверка от 4 кв.2014г. 2 года
С.	Автоклавируемый автоматический дозатор BagPiper на 1мл. в ком-те со стандартн. наконечниками (4000 шт) Зав. № FF 2449	2012г. №10140000004281	Сертификат о калибровке № 000710 от 22.06.2015г. 1 год
Д.	Автоклавируемый автоматический дозатор BagPiper на 1мл. в ком-те со стандартн. наконечниками (4000 шт) Зав. № FF 2518	2012г. №10140000004280	Свидетельство о калибровке № 000732 от 07.07.2015г. 1 год
Е.	Дозатор ДП 2-10мл зав. № BN 74632	2008г. №210104390	Свидетельство о поверке №009853 от 22.06.2015г. 1 год
Ф.	Дозатор ДП 100-1000 мкл зав. № BM 78127	2008г. №7070004138	Свидетельство о поверке №009927 от 22.06.2015г. 1 год
Г.	Дозатор ДП 1-5 мкл. зав.№ 74285	2008г. №210140388	Свидетельство о поверке № 006083 от 16.04.2015г. 1 год
Н.	Дозатор ДП 1-5мл зав. № BP 14525	2008г. №210104387	Свидетельство о поверке №009854 от 22.06.2015г. 1 год
И.	Дозатор ДП 2-10мл зав. № BP 14850	2008г. №7070004145	Свидетельство о поверке №013973 от 07.07.2015г. 1 год
Ж.	Дозатор ДП 100-1000мл зав. № BN 75113	2008г. №7070004139	Свидетельство о поверке №013974 от 07.07.2015г. 1 год
К.	Дозатор ДП 100-1000мл зав. № 13581567	2010г. №10140000004248	Свидетельство о поверке № 006078 от 16.04.2015г. 1 год
Л.	Манометр ДМ-2010- 3 Зав.№576	2008г. без ин.№	Клеймо от 2 кв.2015г. 1 год
М.	Манометр ДМ-2010- 3 Зав.№556	2008г. без ин.№	Клеймо от 2 кв.2015г. 1 год
Н.	Весы Vibra HJR- 200 CE зав. №088685004	2008г. №101600002199	Свидетельство о поверке № 013999 от 07.07.15г. 1 год
О.	Спектрофотометр UNICO 1201 зав. №W0411019	2008г. №10140000003568 5	Свидетельство о поверке № 011495 от 18.06.2015г.
Р.	Термостат электрический суховоздушный ТС 1/80 СПУ зав. № 24002		
Q.	Термостат электрический суховоздушный ТС 1/80 СПУ зав. № 24739		
R.	Термостат электрический суховоздушный ТВ-80-1 зав. № 60		
S.	Автоклав вертикальный 75 л		

Лаборатории имеет лицензию на проведение работ с микроорганизмами III-IV групп патогенности

5.2. Изучаемые штаммы: *Thermothelomyces thermophile*, *Thermomyces lanuginosus*, *Mycothermus thermophilus*, *Myceliophthora fergusii*, *Gilmaniella humicola*

5.3. Питательные среды:

среда № 1 — Чапека-Докса (г/л): сахароза — 20,0; NaNO<sub>3</sub> — 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 1,0; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O — 0,5; KCL — 0,5; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O — 0,01; CaCO<sub>3</sub> — 0,3; дистиллированная вода — 1 л, pH исх. — 6,0-6,2;

среда № 2 — минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% кукурузного початка;

среда № 3 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% лужки риса;

среда № 4 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% рисовых отрубей;

среда №5 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% опилок

среда №6 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% соломы.

Все среды стерилизовались автоклавированием

Дата начала исследования: 23. 03. 2016

Дата окончания исследования: 07.04.2016

### Результаты исследований

Культура	Целлюлаза, ед/мл					
	Среда № 1	Среда № 2	Среда № 3	Среда № 4	Среда № 5	Среда № 6
<i>Thermothelomyces thermophila</i>	0,53±0,03	0,47±0,02	0,53±0,03	0,62±0,03	0,48±0,01	0,46±0,04
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	0,41±0,01	0,44±0,01	0,47±0,02	0,45±0,01	0,47±0,01	0,39±0,01
<i>Mycothermus thermophilus</i>	0,40±0,01	0,46±0,01	0,49±0,02	0,39±0,01	0,38±0,01	0,37±0,02
<i>Myceliophthora fergusii</i>	0,28±0,03	0,22±0,03	0,20±0,01	0,21±0,02	0,19±0,01	0,17±0,01
<i>Gilmaniella humicola</i>	0,26±0,03	0,30±0,02	0,28±0,01	0,27±0,01	0,26±0,01	0,24±0,02

Вывод: Все среды, содержащие в качестве единственного источника углерода древесно-растительный материал, способствовали синтезу исследуемых ферментов. Максимальным уровнем продукции целлюлолитических ферментов характеризовались *Thermothelomyces thermophila*, *Thermomyces lanuginosus* и *Mycothermus thermophilus* – 0,40–0,62 ед/мл. Среда №4 оказалась оптимальной для синтеза данного фермента.

к.м.н.,  
к.б.н.

А.Б. Подволоцкая  
Л.А. Балабанова

## Приложение Б

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования

**«Дальневосточный федеральный университет» (ДФУ)**

Юр. адрес: 690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8

Инновационный технологический центр Тел.: (423) 240-34-39, факс: (423) 240-66-37

e-mail: [lsvk\\_etc@mail.ru](mailto:lsvk_etc@mail.ru)

### ПРОТОКОЛ №6

#### Определение белка в культуральной жидкости методом Лоури

1. Наименование лаборатории: Лабораторный комплекс Инновационного технологического центра Школы экономики и менеджмента ДВФУ
2. Зав. лабораториями Кожедуб И.А., Жездлва С.Б.
3. Исполнитель Балабанова Л.А. Подволоцкая А.Б
4. Наименование метода Определение белка по Лоури Кельдалю ГОСТ 13496.4-93 КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ Методы определения содержания азота и сырого протеина
5. Условия проведения испытаний:

#### Оборудование

№	Наименование СИ, тип (марка)	Год ввода в эксплуатацию, инв. номер	Свидетельство о проверке СИ или сертификат о калибровке СИ (номер, дата, срок действия)
А.	Термометр стеклянный типа ТС-7АМ, зав. № 178	2008г. Без ин.№	Проверка от 4 кв.2014г. 2 года
В.	Термометр стеклянный типа ТС-7АМ, зав. № 00778	2014г. Без ин.№	Проверка от 4 кв.2014г. 2 года
С.	Автоклавируемый автоматический дозатор BagPiper на 1мл. в ком-те со стандартн. наконечниками (4000 шт) Зав. № FF 2449	2012г. №10140000004281	Сертификат о калибровке № 000710 от 22.06.2015г. 1 год
Д.	Автоклавируемый автоматический дозатор BagPiper на 1мл. в ком-те со стандартн. наконечниками (4000 шт) Зав. № FF 2518	2012г. №10140000004280	Свидетельство о калибровке № 000732 от 07.07.2015г. 1 год
Е.	Дозатор ДП 2-10мл зав. № ВN 74632	2008г. №210104390	Свидетельство о проверке №009853 от 22.06.2015г. 1 год
Ф.	Дозатор ДП 100-1000 мкл зав. № ВМ 78127	2008г. №7070004138	Свидетельство о проверке №009927 от 22.06.2015г. 1 год
Г.	Дозатор ДП 1-5 мкл. зав.№ 74285	2008г. №210140388	Свидетельство о проверке № 006083 от 16.04.2015г. 1 год
Н.	Дозатор ДП 1-5мл зав. № ВР 14525	2008г. №210104387	Свидетельство о проверке №009854 от 22.06.2015г. 1 год
И.	Дозатор ДП 2-10мл зав. № ВР 14850	2008г. №7070004145	Свидетельство о проверке №013973 от 07.07.2015г. 1 год
Ж.	Дозатор ДП 100-1000мл зав. № ВN 75113	2008г. №7070004139	Свидетельство о проверке №013974 от 07.07.2015г. 1 год
К.	Дозатор ДП 100-1000мл зав. № 13581567	2010г. №10140000004248	Свидетельство о проверке № 006078 от 16.04.2015г. 1 год
Л.	Манометр ДМ-2010- 3 Зав.№576	2008г. без ин.№	Клеймо от 2 кв.2015г. 1 год
М.	Манометр ДМ-2010- 3 Зав.№556	2008г. без ин.№	Клеймо от 2 кв.2015г. 1 год
Н.	Весы Vibra HJR- 200 CE зав. №088685004	2008г. №101600002199	Свидетельство о проверке № 013999 от 07.07.15г. 1 год
О.	Спектрофотометр UNICO 1201 зав. №W0411019	2008г. №10140000003568 5	Свидетельство о проверке № 011495 от 18.06.2015г.
Р.	Термостат электрический суховоздушный ТС 1/80 СПУ зав. № 24002		
Q.	Термостат электрический суховоздушный ТС 1/80 СПУ зав. № 24739		

R.	Термостат электрический суховоздушный ТВ-80-1 зав. № 60
S.	Автоклав вертикальный 75 л
T.	Лабораторная программируемая двухкамерная печь ПДП-«Аналитика»
U.	Автоматический аппарат Кьельдаля ВИЛИТЕК АКВ-20

Лаборатории имеет лицензию на проведение работ с микроорганизмами III-IV групп патогенности

5.2. Изучаемые штаммы: *Thermothelomyces thermophila*, *Thermomyces lanuginosus*, *Gilmaniella humicola*, *Mycothermus thermophilus*.

5.3. Питательные среды:

среда № 1 — Чапека-Докса (г/л): сахароза — 20,0; NaNO<sub>3</sub> — 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 1,0; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O — 0,5; KCL — 0,5; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O — 0,01; CaCO<sub>3</sub> — 0,3; дистиллированная вода — 1 л, pH исх. — 6,0-6,2;

среда № 2 — минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% кукурузного початка;

среда № 3 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% лузги риса;

среда № 4 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% рисовых отрубей;

среда № 5 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% опилок

среда № 6 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% соломы.

Все среды стерилизовались автоклавированием

Дата начала исследования: 24. 03. 2016

Дата окончания исследования: 08.04.2016

#### Результаты исследований

Источник углерода, содержание в %	Белок, мг/мл			
	<i>Thermothelomyces thermophila</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Gilmaniella humicola</i>	<i>Mycothermus thermophilus</i>
Среда № 1	3,65	3,07	2,07	2,47
Среда № 2	2,75	2,94	1,91	1,08
Среда № 3	2,50	3,05	2,70	2,55
Среда № 4	3,7	3,01	2,95	3,54
Среда № 5	3,20	2,41	2,50	2,70
Среда № 6	3,60	3,21	2,97	2,58

Вывод; наиболее перспективный штамм по способности продуцировать белок *M. thermophila*

к.м.н.,  
к.б.н.

А.Б. Подволоцкая  
Л.А. Балабанова

## Приложение В

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования

«Дальневосточный федеральный университет» (ДФУ)

Юр. адрес: 690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8

Инновационный технологический центр Тел.: (423) 240-34-39, факс: (423) 240-66-37

e-mail: [lsvk\\_itc@mail.ru](mailto:lsvk_itc@mail.ru)

### ПРОТОКОЛ №7

#### Определение массовой доли белка в культуральной жидкости ГОСТ 13496.4-93

1. Наименование лаборатории: Лабораторный комплекс Инновационного технологического центра Школы экономики и менеджмента ДВФУ
2. Зав. лабораториями Кожедуб И.А., Жездлва С.В.
3. Исполнитель Балабанова Л.А. Подволоцкая А.Б
4. Наименование метода ГОСТ 13496.4-93 КОРМА, КОМБИКОРМА, КОМБИКОРМОВОЕ СЫРЬЕ Методы определения содержания азота и сырого протеина
5. Условия проведения испытаний:

#### Оборудование

№	Наименование СИ, тип (марка)	Год ввода в эксплуатацию, инв. номер	Свидетельство о поверке СИ или сертификат о калибровке СИ (номер, дата, срок действия)
А.	Термометр стеклянный типа ТС-7АМ, зав. № 178	2008г. Без ин.№	Поверка от 4 кв.2014г. 2 года
В.	Термометр стеклянный типа ТС-7АМ, зав. № 00778	2014г. Без ин.№	Поверка от 4 кв.2014г. 2 года
С.	Автоклавируемый автоматический дозатор BagPiper на 1мл. в ком-те со стандартн. наконечниками (4000 шт) Зав. № FF 2449	2012г. №10140000004281	Сертификат о калибровке № 000710 от 22.06.2015г. 1 год
Д.	Автоклавируемый автоматический дозатор BagPiper на 1мл. в ком-те со стандартн. наконечниками (4000 шт) Зав. № FF 2518	2012г. №10140000004280	Свидетельство о калибровке № 000732 от 07.07.2015г. 1 год
Е.	Дозатор ДП 2-10мл зав. № ВN 74632	2008г. №210104390	Свидетельство о поверке №009853 от 22.06.2015г. 1 год
Ф.	Дозатор ДП 100-1000 мкл зав. № ВМ 78127	2008г. №7070004138	Свидетельство о поверке №009927 от 22.06.2015г. 1 год
Г.	Дозатор ДП 1-5 мкл. зав.№ 74285	2008г. №210140388	Свидетельство о поверке № 006083 от 16.04.2015г. 1 год
Н.	Дозатор ДП 1-5мл зав. № ВР 14525	2008г. №210104387	Свидетельство о поверке №009854 от 22.06.2015г. 1 год
И.	Дозатор ДП 2-10мл зав. № ВР 14850	2008г. №7070004145	Свидетельство о поверке №013973 от 07.07.2015г. 1 год
Ж.	Дозатор ДП 100-1000мл зав. № ВN 75113	2008г. №7070004139	Свидетельство о поверке №013974 от 07.07.2015г. 1 год
К.	Дозатор ДП 100-1000мл зав. № 13581567	2010г. №10140000004248	Свидетельство о поверке № 006078 от 16.04.2015г. 1 год
Л.	Манометр ДМ-2010- 3 Зав.№576	2008г. без ин.№	Клеймо от 2 кв.2015г. 1 год
М.	Манометр ДМ-2010- 3 Зав.№556	2008г. без ин.№	Клеймо от 2 кв.2015г. 1 год
Н.	Весы Vibra HJR- 200 CE зав. №088685004	2008г. №101600002199	Свидетельство о поверке № 013999 от 07.07.15г. 1 год
О.	Спектрофотометр UNICO 1201 зав. №W0411019	2008г. №10140000003568 5	Свидетельство о поверке № 011495 от 18.06.2015г.
Р.	Термостат электрический суховоздушный ТС 1/80 СПУ зав. № 24002		

Q.	Термостат электрический суховоздушный ТС 1/80 СПУ зав. № 24739
R.	Термостат электрический суховоздушный ТВ-80-1 зав. № 60
S.	Автоклав вертикальный 75 л
T.	Лабораторная программируемая двухкамерная печь ПДП-«Аналитика»
U.	Дигестор (печи для химической минерализации проб) серии ПМП
V.	Автоматический аппарат Кьельдаля ВИЛИТЕК АКВ-20

Лаборатории имеет лицензию на проведение работ с микроорганизмами III-IV групп патогенности

5.2. Изучаемые штаммы: *Thermothelomyces thermophila*, *Thermomyces lanuginosus*, *Mycothermus thermophilus*, *Gilmaniella humicola*.

среда № 1 — Чапека-Докса (г/л): сахароза — 20,0; NaNO<sub>3</sub> — 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 1,0; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O — 0,5; KCL — 0,5; FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O — 0,01; CaCO<sub>3</sub> — 0,3; дистиллированная вода — 1 л, pH исх. — 6,0-6,2;

среда № 2 — минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% кукурузного початка;

среда № 3 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% лузги риса;

среда № 4 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% рисовых отрубей;

среда №5 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% опилок

среда №6 минеральный фон среды Чапека Докса в присутствии 5-10% соломы.

Все среды стерилизовались автоклавированием

Дата начала исследования: 24. 03. 2016

Дата окончания исследования: 08.04.2016

#### Результаты исследований

Источник углерода, содержание в %	Белок, % в пересчете на сухое вещество				
	Фон в питательной среде	<i>Thermothelomyces thermophila</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Mycothermus thermophilus</i>	<i>Gilmaniella humicola</i>
Среда № 1	23,4	22,1	16,5	18,9	16,58
Среда № 2	29,3	27,2	23,5	25,6	22,5
Среда № 3	5,8	8,9	7,5	9,2	7,9
Среда № 4	13,5	19,9	19,2	16,3	19,3
Среда № 5	2,3	7,8	1,2	3,0	2,2
Среда № 6	1,2	1,2	0,9	2,7	1,7

Вывод; наиболее перспективный штамм по способности продуцировать белок *M. thermophila*

к.м.н.,  
к.б.н.

А.Б. Подволоцкая  
Л.А. Балабанова

## Приложение Г

### Публикации в научных сборниках

1. П.К. Базюх Мониторинг сельскохозяйственного производства для биотехнологического получения белково-углеводных кормов на основе растительных отходов. // Новая экономика, бизнес и общество: сборник материалов апрельской научно-практической конференции молодых учёных ШЭМ (г. Владивосток, 28 апреля 2017 г.). – С. 948-953.

2. Базюх П.К., Ларионова А.А., Слепченко Л.В., Шкрыль Ю.Н., Югай Ю.А., Балабанова Л.А. Разработка векторной системы для эффективной генетической трансформации мицелиальных грибов как перспективных продуцентов белков. // Новое в технологии и технике функциональных продуктов питания на основе медико-биологических воззрений. Сборник статей VII Международной научно-технической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, профессора Зубченко А.В. (Воронеж, 13-15 июня 2018 года). – С. 317-321.

## Приложение Д



**Школа экономики  
и менеджмента**

# ДИПЛОМ

## НАГРАЖДАЕТСЯ

**Базюх Павел Константинович,**

*магистрант 1 курса, направление подготовки «Товароведение»,  
заяввший (ая)*

## II место

**на секции «Зеленая революция: экономический рост без  
ущерба для экологии»**

**в рамках Апрельской научно-практической конференции  
молодых ученых «Новая экономика, бизнес и общество»**

**Тема доклада: «Мониторинг сельскохозяйственного  
производства для биотехнологического получения белково-  
углеводных кормов»**

*Научный руководитель – Балабанова Л.А., канд. биол. наук*

**Директор**



**Е.Б.Гаффорова**

**20 апреля 2017  
г. Владивосток**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Дальневосточный федеральный университет»

---

**ШКОЛА ЭКОНОМИКИ И МЕНЕДЖМЕНТА**

**Кафедра товароведения и экспертизы товаров**

**ОТЗЫВ РУКОВОДИТЕЛЯ**

на выпускную квалификационную работу студента Базюха Павла Константиновича  
специальность «38.04.07 Товароведение» группа М12116  
на тему «Оптимизация биотехнологической конверсии растительного сырья для получения белковых кормов»

Руководитель ВКР канд. биол. наук, профессор Л.А. Балабанова

Дата защиты ВКР « 6 » июля 2018 г.

Представленная к рассмотрению выпускная квалификационная работа посвящена исследованию путей оптимизации биотехнологической конверсии растительного сырья для получения белковых кормов. Необходимость в таком исследовании продиктована созданием прочной кормовой базы – повышение качества кормов разных видов, внедрение высокоэффективных способов и средств их производства, приготовления, способствующих высокой усвояемости животными питательных веществ, содержащихся в кормах и обеспечивающих их рациональное использование.

Основными задачами данной работы являются выделение и идентификация мицелиальных грибов и скрининг их штаммов как продуцентов белков и ферментов, способных разрушать трудногидролизуемые растительные субстраты; оптимизация состава растительных субстратов для культивирования этих штаммов; определение устойчивости к антибиотикам для возможности их использования в модификации ферментного профиля и транскриптомный анализ мицелиального гриба *Mycothermus thermophilus*, как эффективного продуцента широкого спектра полисахарид-деградирующих ферментов и гликозидаз, обеспечивающих полную конверсию выбранных растительных субстратов.

В процессе выполнения выпускной квалификационной работы Базюх П.К. справился с поставленными задачами. Знания, полученные за время обучения, позволили ему применить в своей работе современные методы микробиологии, биохимии и молекулярной биологии.

Настойчивость и умение организовать свою работу, использовать самые разнообразные источники информации по тематике ВКР позволили дипломнику выполнить задание в сроки.

установленные кафедрой. Базюх П.К. проявил себя дисциплинированным, стремящимся к получению знаний, навыков и умений.

При проверке данной работы в системе «Антиплагиат», результат составлял 19 % совпадений.

Заключение: заслуживает оценки отлично и присвоения квалификации «магистр»

Руководитель ВКР канд. биол.наук, профессор  Л.А. Балабанова  
(ученая степень, ученое звание) (подпись) (и.о.фамилия)

«03» июля 2018 г