

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

*На правах рукописи*



Дедков Виталий Николаевич

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ КОРМОВОГО БЕЛКА ИЗ  
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата технических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Павловская Н.Е.

Воронеж - 2014

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Проблема кормового белка в мире и РФ.....	11
1.2 Производство кормового белка из малоценного растительного сырья..	16
1.3 Микробный синтез в производстве кормового белка.....	19
1.4 Характеристика соломы зерновых культур как перспективного сырья для биотехнологической переработки.....	31
1.5 Состояние с производством кормов в Орловской области и перспектива развития направления.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	82
3.1 Изучение соломы зерновых культур как сырья для получения кормового белка.....	82
3.2 Исследование способов подготовки исследуемого целлюлозосодержащего сырья.....	83
3.3 Подбор режимов твердофазной ферментации (ТФФ) целлюлозосодержащего сырья .....	86
3.4 Подбор режимов глубинной гетерофазной биоферментации целлюлозосодержащего сырья.....	89
3.5 Микробиологическая переработка целлюлозосодержащего сырья биопрепаратом Байкал ЭМ-1.....	91
3.6 Биотехнологическая переработка соломы зерновых культур (пшеницы и гречихи) грибами рода <i>Trichoderma harzianum</i> на кормовой белок.....	96
3.7 Использование гриба <i>Fusarium oxysporum</i> для глубинной гетерофазной ферментации соломы яровой мягкой пшеницы.....	102
3.8 Испытание на токсичность полученных кормовых продуктов.....	107
3.9 Испытание полученных кормовых продуктов в бройлерном птицеводстве.....	110
3.10 Прогноз экономической эффективности предложенной технологии переработки соломы на полезные продукты.....	115
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	141

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в России наблюдается дефицит продуктов животноводства для населения в связи с недостатком переваримого протеина в комбикормовой промышленности. В традиционных рецептах комбикормов доля зерновых компонентов составляет 60-80%<sup>1</sup>. При этом мировые запасы зерна сокращаются, а продолжающееся увеличение производства зерновых культур отстает от роста потребления, связанного с интенсивным увеличением спроса. Еще одной проблемой мирового животноводства является несбалансированность белков в кормах растительного происхождения по аминокислотному составу<sup>2</sup>. Увеличение рациона в этом случае не способствует повышению усвояемости корма и его питательности, а себестоимость продукции при этом возрастает<sup>3</sup>.

Наряду с этим, во всех странах имеются и постоянно накапливаются большие запасы малоиспользуемых или вообще неиспользуемых отходов сельского хозяйства, растениеводства, животноводства, зерноперерабатывающих и других производств, характеризующиеся низкой кормовой ценностью из-за наличия трудногидролизуемых полисахаридов и невысокого содержания усваиваемого белка, которые после соответствующей обработки могут приобретать кормовые свойства в 1,5-3,0 раза превосходящие фуражное зерно хорошего качества<sup>4,5</sup>.

Биотехнология обладает обширными возможностями, так как ее методы выгоднее традиционных: они более производительны, используются при

---

<sup>1</sup> Красильников, О.Ю. Возможности альтернативного кормопроизводства в России / О.Ю. Красильников // Птицеводческое хозяйство. Птицефабрика. – 2011. - № 7.

<sup>2</sup> Лемешева, М.М. Аминокислотное питание птицы / М.М. Лемешева // Кубанский сельскохозяйственный информационно-консультационный центр Государственное бюджетное учреждение Краснодарского края [Электронный ресурс] / ГБУ Кубанский СИКЦ. – Электрон. текстовые дан. – Краснодар, 2011. - Режим доступа : <http://www.kaicc.ru/otrasli/pticevodstvo/aminokislotnoe-pitanie-pticy>. – Заглавие с экрана.

<sup>3</sup> Панфилов, В.И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дис. ... д-ра техн. наук : 03.00.23 / В. И. Панфилов ; РГБ ОД. – М., 2004 – 371 с.

<sup>4</sup> Гнеушева, И.А. Биотехнологические подходы для получения белково-углеводных кормовых добавок для животноводства / И.А. Гнеушева, И.В. Горькова, В.Н. Дедков // Развитие инновационного потенциала агропромышленного производства: Материалы Всероссийской научно-практической конференции 24 ноября 2010 года. – Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2010. – С. 45 – 48.

<sup>5</sup> Перегудов, С.С. Отходы в доходы / С.С. Перегудов // Торгпред. – 2005. - № 1. – С. 28.

оптимальных условиях, экологически чисты, не требуют химических реактивов и т. д.<sup>1</sup>. Биотехнология создает рациональные и безвредные для человека и среды процессы конверсии продуктов сельского хозяйства в более ценные товарные формы<sup>2</sup>. Кроме того, переход от традиционных способов переработки растительного сырья к биотехнологическим во многих случаях становится единственной возможностью для создания малоотходных технологий и экологически чистых производств<sup>3</sup>. Из этого следует, что применение биотехнологии в сельскохозяйственном производстве – очень перспективное направление.

Все чаще с целью получения полноценных сбалансированных кормов для сельскохозяйственных животных большое внимание уделяют микробиологическим методам. Грибы (высшие и низшие) являются ценными продуцентами белков, способными использовать в качестве субстрата мелассу, молочную сыворотку, сок растений, лигнин, клетчатку, целлюлозосодержащие отходы пищевой и деревообрабатывающей промышленности<sup>4</sup>. Белки грибного мицелия по содержанию незаменимых аминокислот близки к белкам сои. Они богаты лизином, имеют высокую биологическую ценность и усвояемость. Для промышленного культивирования подобраны быстрорастущие штаммы грибов из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*. В биомассе этих грибов синтезируется 20 – 60 % белков от сухой массы<sup>5</sup>.

Актуальным является получение экологически чистых кормовых продуктов в рамках комплексной переработки малоиспользуемого сырья для решения проблем дефицита кормового белка, безвредных для человека средств защиты растений и т.д. Все более насущным становится вопрос о расширении

---

<sup>1</sup> Ефимова, М.В. Введение в прикладную биотехнологию : учебное пособие / М.В. Ефимова. – Петропавловск-Камчатский : КамчатГТУ, 2004. – 96 с.

<sup>2</sup> Ефимова, М.В. Введение в прикладную биотехнологию : учебное пособие / М.В. Ефимова. – Петропавловск-Камчатский : КамчатГТУ, 2004. – 96 с.

<sup>3</sup> Тарабукин, Д.В. Ферментативные технологии направленной биоконверсии целлюлозо- и крахмалсодержащего растительного сырья : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / Д.В. Тарабукин ; Институт биологии Уфимского научного центра РАН. – Уфа, 2009. – 26 с.

<sup>4</sup> Лобанок, А.Г. Микробный синтез на основе целлюлозы: Белок и другие ценные продукты / А. Г. Лобанок, В. Г. Бабицкая, Ж. Н. Богдановская. - Мн. : Наука и техника, 1988. - 261 с.

<sup>5</sup> Saleh, A.M. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum* / A.M. Saleh, M.F. Nevin, N.H. Ebtsam [and others] // Journal of Biotechnology. – 2006. - № 127. – p. 54 – 64.

кормовой базы, в частности, использование нетрадиционных энергетических и белковых источников, то есть повышение питательности целлюлозосодержащих отходов сельскохозяйственных производств обладающих низкой кормовой ценностью, но являющихся источником углеводов, в том числе соломы как недифицитного отхода растениеводства<sup>1</sup>.

Имеющиеся в открытой печати литературные данные подтверждают целесообразность переработки отходов сельскохозяйственного производства, в частности, соломы зерновых культур в ценные кормовые продукты с улучшенными питательными свойствами. Подобными исследованиями в разное время занимались многие ученые: Алимова Ф.К., Беловежец Л.А., Бойко И.И., Борисенков М.Ф., Вершинина В.Н., Громов С.И., Ездаков Н.В., Закордонец Л.А., Зафрен С.Я., Зелтиня М., Леснов П.А., Леснов А.П., Панфилов В.И., Перегудов С.С., Подгорская В.С., Саловарова В.П., Сушкова В.И., Тарабукин Д.В., Эрнст Л.К., Bailey M.J., Bisaria V.S., Doelle H.W., Kristensen J.B., Lijuan G., Mosier N., Murray M.Y., Toride Y., Santos A.L.F. Однако в их работах мало внимания уделено такому отходу сельскохозяйственного производства как солома зерновых культур, в частности, соломе яровой пшеницы и гречихи. В настоящее время для разрушения трудногидролизуемых полисахаридов в целлюлозосодержащем сырье чаще всего применяются химические методы. Данная технология является довольно дорогостоящей, не способствует улучшению питательных свойств сырья, а образующиеся в результате отходы загрязняют окружающую среду, в то время как переработка соломы зерновых с использованием микроорганизмов не только снижает содержание клетчатки, но и обогащает её протеином, витаминами, аминокислотами и пробиотическими компонентами.

Основными продуцентами кормового белка в промышленном производстве являются кормовые дрожжи (*Candida*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*), бактерии (*Methylococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Corinecteri*), одноклеточные водоросли (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*),

---

<sup>1</sup> Леснов, А.П. Солома как энергетический и белковый источник для животноводства / А.П. Леснов // Машинно-технологическая станция. – 2008. - № 6. – С. 51 – 54.

микроскопические грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*). Сведений об использовании гриба *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum* и комплексного препарата Байкал ЭМ-1 для комплексной переработки малоиспользуемого сырья, в частности, соломы зерновых культур при решении проблем дефицита кормового белка нами не найдено.

На основании вышесказанного, представляется актуальным найти микроорганизмы-продуценты целлюлолитических ферментов, обладающие кормовой ценностью и разработать технологию переработки соломы зерновых ферментативным способом с последующим выращиванием на полученных гидролизатах этих микроорганизмов. Это позволит проводить гидролиз сырья и культивацию микроорганизмов для получения кормового продукта непосредственно в фермерском хозяйстве, используя отходы своего же производства.

Использование отходов сельскохозяйственного производства с целью обогащения их микробным белком позволит решить экологические проблемы, возникающие при реализации технологий переработки, а также расширит сырьевую базу для получения кормовых продуктов<sup>1</sup>.

В настоящее время в аграрных регионах России проблема утилизации соломы зерновых культур в ценные продукты еще не нашла надлежащего инженерного воплощения. Для развития технологии глубокой переработки соломы зерновых культур необходим комплексный подход, учитывающий как недостатки известных технологий, так и потребности в продуктах вторичной переработки сырья.

Работа выполнялась в период с 2010 по 2013 г.г. в соответствии с Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 - 2012 годы» (разработана в соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации от 6 июля 2006 г. № 977-р) и отвечает

---

<sup>1</sup> Смирнова, В.Д. Отходы производства концентрированных белковых продуктов из сои как сырье для получения кормовых добавок : автореф. дис. ... канд. техн. наук : 03.01.06 / В.Д. Смирнова ; Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева. – М., 2012. – 19 с.

пункту 8 «Нано-, био-, информационные, когнитивные технологии» «Перечня критических технологий Российской Федерации» (утв. Указом Президента РФ от 7 июля 2011 г. N 899).

**Цель и задачи исследований.** На основании вышесказанного целью диссертационного исследования явилась разработка технологии комплексной переработки соломы яровой пшеницы и гречихи с использованием грибов *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* и препарата Байкал ЭМ-1 для получения кормового продукта.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать режимы поэтапной предобработки соломы яровой пшеницы и гречихи для биоконверсии;
2. Составить технологические схемы комплексной переработки соломы зерновых в кормовой белок;
3. Подобрать режимы различных способов ферментации исследуемого целлюлозосодержащего сырья;
4. Интенсифицировать процесс конверсии ферментативного гидролизата соломы биостимулятором роста микроорганизмов;
5. Изучить токсичность полученных кормовых продуктов;
6. Рассчитать предварительную экономическую эффективность предложенной технологии переработки соломы на полезные кормовые продукты.

**Научная новизна результатов исследования.**

Научно обоснованы и экспериментально подтверждены параметры предобработки измельченной соломы яровой пшеницы и гречихи, обеспечивающие разрушение лигнин-целлюлозного комплекса, что способствует последующему ферментативному гидролизу исследуемого сырья с использованием микроорганизмов.

Подобраны оптимальные режимы глубинной гетерофазной и твердофазной биоферментации исследуемого целлюлозосодержащего сырья.

Выявлена возможность применения грибов *F. oxysporum*, *T. harzianum* и микробиологического препарата Байкал ЭМ-1 в биоконверсии соломы зерновых с целью получения белкового кормового продукта и установлена эффективность его использования для животноводства и птицеводства.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Научно обоснована эффективность использования фитопатогенного несовершенного гриба *F. oxysporum* и микробиологического препарата Байкал ЭМ-1 в биоконверсии соломы зерновых с целью получения белкового кормового продукта.

Разработана комплексная безотходная технология биоконверсии соломы зерновых в кормовой белок с использованием микроорганизмов препарата Байкал ЭМ-1, препаратов продуцентов *T. harzianum*, *F. Oxysporum*.

Проведена промышленная апробация и внедрение биотехнологии обогащенных кормовых добавок на основе растительного сырья в условиях ЗАО «Березки»

Разработаны рекомендации по применению в бройлерном птицеводстве белковых продуктов с повышенной питательной ценностью, полученных на основе ферментализатов соломы яровой мягкой пшеницы и гречихи.

Получено положительное решение на заявку «Способ микробиологической обработки целлюлозосодержащих материалов» (№2013147322(073556 от 23.10.2013 г).

Материалы диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий для бакалавров направления подготовки - 240700 «Биотехнология» в ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный университет».

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

– результаты исследований по переработке растительного сырья в кормовые продукты методами глубинной и твердофазной ферментации с использованием грибов *Trichoderma harzianum* и *Fusarium oxysporum*, а также комплексного препарата «Байкал ЭМ-1»;

– технологические схемы биотехнологии обогащенных кормовых добавок на основе соломы зерновых

### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Достоверность результатов работы подтверждается корректным использованием теоретических и экспериментальных методов обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на региональных, всероссийских и международных научно-практических конференциях и конгрессах, в том числе: всероссийской научно-практической конференции «Развитие инновационного потенциала агропромышленного производства» (Орел, 2010), VI Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011), всероссийской научно-практической конференции «Охрана труда 2011. Актуальные проблемы и пути их решения» (Орел, 2011), международной научно-практической конференции «Инновации аграрной науки и производства» (Орел, 2011), региональной научно-практической конференции молодых ученых «Современный агропромышленный комплекс глазами молодых исследователей» (Орел, 2012), VII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013), на ежегодных отчетных научных конференциях ФГБОУ ВПО «ОрелГАУ» по итогам научно-исследовательской работы за 2010-2013 гг.

Работа участвовала во всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Министерства сельского хозяйства Российской Федерации (Краснодар, 2012), где заняла 3-е место во втором туре и 11-е в третьем.

Производственная апробация работы осуществлялась в ЗАО «Березки», в период с января по май 2013. Получен акт о внедрении завершенной научной работы в производство.

По основным результатам исследований опубликовано 12 работ, в том числе 5 статей, в изданиях, рекомендованных ВАК РФ; 1 учебном пособии (гриф УМО).

**Объём и структура работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальных результатов и их обсуждения, выводов и библиографического списка, содержащего 187 источников. Работа изложена на 140 страницах машинописного текста и включает в себя 18 таблиц, 22 рисунка и 4 приложения.

Во **введении** дана общая характеристика работы, обоснована актуальность научного направления, отмечены практическая значимость и новизна исследований, представлены основные положения, выносимые на защиту.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Проблема кормового белка в мире и РФ

В настоящее время в мире наблюдается дефицит продуктов животноводства для населения в связи с недостатком переваримого протеина в комбикормовой промышленности<sup>1</sup>. В рецептах комбикормов, произведенных по традиционной технологии, доля зерновых компонентов составляет 60 – 80 %<sup>2</sup>. При этом интенсивное увеличение спроса влечет за собой сокращение мировых запасов зерна, которые уже невозможно восполнить увеличением производства. В то же время во многих странах имеются и постоянно накапливаются большие запасы малоиспользуемых отходов сельского хозяйства, растениеводства, животноводства, зерноперерабатывающих и других производств, характеризующиеся низкой кормовой ценностью из-за наличия трудногидролизуемых полисахаридов и невысокого содержания усваиваемого белка, которые после соответствующей обработки могут приобретать кормовые свойства в 1,5 – 3,0 раза превосходящие фуражное зерно хорошего качества<sup>3,4</sup>.

Большинство кормов, используемых в животноводстве, не содержат в достаточном количестве белков и витаминов<sup>5</sup>. Даже такие ценные корма, как кукуруза и сахарная свекла, дающие максимальное количество кормовых единиц с гектара, богаты углеводами, но не содержат достаточного количества азотистых веществ, что приводит к дефициту кормового белка. Этот дефицит покрывается увеличением производства растительного протеина, содержащегося в сельскохозяйственных кормовых культурах: зерне, люцерне, выпуском рыбной и мясной муки, сухих молочных продуктов.

---

<sup>1</sup> Speedy, A.W. Overview of world feed protein needs and supply / A.W. Speedy // Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 29 April – 3 May 2002. – 2004. - № 1. – p. 9 – 29.

<sup>2</sup> Красильников, О.Ю. Возможности альтернативного кормопроизводства в России / О.Ю. Красильников // Птицеводческое хозяйство. Птицефабрика. – 2011. - № 7.

<sup>3</sup> Гнеушева, И.А. Биотехнологические подходы для получения белково-углеводных кормовых добавок для животноводства / И.А. Гнеушева, И.В. Горькова, В.Н. Дедков // Развитие инновационного потенциала агропромышленного производства: Материалы Всероссийской научно-практической конференции 24 ноября 2010 года. – Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2010. – С. 45 – 48.

<sup>4</sup> Перегудов, С.С. Отходы в доходы / С.С. Перегудов // Торгпред. – 2005. - № 1. – С. 28.

<sup>5</sup> Хохрин, С.Н. Корма и кормление животных / С.Н. Хохрин. – Санкт-Петербург : Лань, 2003. – 512 с.

Дефицит белка, равно как и его потребление, неуклонно растет. Прогнозы же специалистов в отношении обеспеченности белком за счет традиционных способов его производства далеко не оптимистичны<sup>1,2</sup>.

По данным ряда специалистов мировой дефицит белка кормов к началу XXI века оценивается в 30 - 35 млн. тонн в год<sup>3</sup>. Недостаток кормового белка сдерживает развитие животноводства<sup>4</sup>. Белки являются обязательными компонентами клеток любого живого организма. Они выполняют жизненно важные функции: каталитические регуляторные, транспортные, биоэнергетические, защитные от инфекции и действия стрессовых факторов, структурные, запасные и др<sup>5</sup>. Для предотвращения перерасхода кормов необходимо контролировать, с одной стороны, сбалансированность белков корма по содержанию незаменимых аминокислот, а с другой стороны, количество белка в корме<sup>6</sup>. Наличие незаменимых аминокислот (не синтезируемых в организме животного) обуславливает биологическую ценность белка<sup>7,8</sup>. Недостаток какой-либо из аминокислот в кормах лимитирует усвояемость остальных, приводит к перерасходу кормов и должен компенсироваться концентрированными кормами. Среди зерновых и зернобобовых культур наиболее сбалансирован по содержанию незаменимых аминокислот белок зерна сои, риса и гороха. В вегетативной массе растений на

---

<sup>1</sup> Панфилов, В.И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дис. ... д-ра техн. наук : 03.00.23 / В. И. Панфилов ; РГБ ОД. – М., 2004 - 371 с.

<sup>2</sup> Leng, R.A. Requirements for protein meals for ruminant meat production in developing countries / R.A. Leng // Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 29 April – 3 May 2002. – 2004. - № 1. – p. 225 – 255.

<sup>3</sup> Пат. 2391859 Российская Федерация, МПК<sup>7</sup> А 23 К 1/16, А 23 К 1/14. Способ получения белково-витаминого корма / Честнов С.Н. ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «БИОПРОТЕИН». - № 2007147178/13 ; заявл. 21.12.2007 ; опубл. 20.06.2010, Бюл. № 17. – 10 с.

<sup>4</sup> Решение проблемы кормового белка в стране / Минсельхоз России // Министерство сельского хозяйства Российской Федерации [Электронный ресурс] : официальный интернет-портал / ФГУП «ГВЦ Минсельхоза России». – Электрон. текстовые и граф. дан. – М., 2009. – Режим доступа : <http://www.mcx.ru/documents/document/show/8581.191.htm>. - Заглавие с экрана.

<sup>5</sup> Макасева, О.Н. Белки и нуклеиновые кислоты : конспект лекций для студентов / О.Н. Макасева. – Могилев : Изд-во Могилевского гос. унив. продовольствия, 2004. – 70 с.

<sup>6</sup> Crampton, E.W. Protein Problem in Animal Feeding / E.W. Crampton // Can J Comp Med Vet Sci. – 1943. – № 7(11). – p. 321 – 326.

<sup>7</sup> Губергриц, А.Я. Лечебное питание: справ. пособие / А.Я. Губергриц, Ю.В. Линеvский. – 3-е изд. перераб. и доп. – К. : Выща шк. Головное изд-во, 1989. – 398 с.

<sup>8</sup> Toride Y. Lysine and other amino acids for feed: production and contribution to protein utilization in animal feeding / Y. Toride // Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 29 April – 3 May 2002. – 2004. - № 1. – p. 161 – 167.

долю белков приходится 5—15 % сухого вещества, в зерне злаков — 8 — 18%, семенах масличных растений 16—28 %, зерне зернобобовых культур — 20 — 40 %<sup>1</sup>.

Если содержание белков в растительной массе, используемой для кормления сельскохозяйственных животных, ниже требуемой нормы, то во избежание перерасхода кормов и повышения себестоимости животноводческой продукции количество белка в корме балансируют путем добавления белковых концентратов<sup>2</sup>. По такому же принципу контролируют содержание в кормовом белке незаменимых аминокислот. Недостающее до нормы количество какой-либо аминокислоты балансируют добавлением в корм чистых препаратов дефицитных аминокислот или белковой массы, имеющей более высокое содержание данной аминокислоты по сравнению с принятым эталоном<sup>3</sup>.

На российском рынке кормового белка по объёму натуральных продаж лидирует белковый концентрат метанового брожения. В 2011 г доля белкового концентрата от общего объёма продаж составила почти 90 % (117 тыс. т). На втором месте по объёму продаж – кормовые дрожжи с долей в 8 % (10,3 тыс. т). Соответственно доля продаж кормовых бактерий в России в 2011 г не превысила 3 % (3,4 тыс. т). Большая часть продаваемого в России белкового концентрата импортируется из-за границы. В 2011 г объём импорта белкового концентрата составил почти 123 тыс. т<sup>4</sup>.

Кормовой белок на российском рынке практически полностью реализуются через внутреннюю торговлю. В 2007 – 2011 гг доля внутренних натуральных продаж в структуре спроса составляла в среднем 76,2 %. Доля экспорта в объёме спроса за 2007 – 2011 гг не превышала 24 %. В 2007 – 2011 гг

---

<sup>1</sup> Муравин, Э.А. Агрехимия / Э.А. Муравин. – М. : КолосС, 2003. – 384 с.

<sup>2</sup> Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных : справ. пособие / А.П. Калашников, В.И. Фисинин, В.В. Щеглов [и др.]. – 3-е издание переработанное и дополненное. – М. : Изд-во ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии, 2003. – 456 с.

<sup>3</sup> Владимиров, Н.И. Кормление сельскохозяйственных животных : учебное пособие / Н.И. Владимиров, Л.Н. Черемнякова, В.Г. Луницын [и др.]. – Барнаул : Изд-во АГАУ, 2008. – 212 с.

<sup>4</sup> Анализ рынка кормового белка в России в 2007 - 2011 гг, прогноз на 2012-2016 гг : демонстрационная версия отчета / BusinesStat // РБК - Исследования рынка, готовые маркетинговые исследования и на заказ, маркетинговый план, бизнес-планы [Электронный ресурс] / РосБизнесКонсалтинг. – Электрон. текстовые и граф. дан. – М., 2012. – Режим доступа : <http://marketing.rbc.ru/research/562949983244233.shtml>. - Заглавие с экрана.

экспорт кормового белка из России изменялся в пределах от 33,6 тыс. т до 60,5 тыс. тонн в год. С 2007 по 2011 гг спрос на кормовой белок в России уменьшился на 2% со 184 до 180 тыс. тонн. Наибольший рост спроса относительно предыдущих лет наблюдался в 2008 г – 13,9 %. Основная причина увеличения спроса на кормовой белок в 2008 г – рост натурального объёма экспорта из России на 19 % относительно 2007 г. На протяжении 2009 - 2011 гг в Росси наблюдается падение спроса на кормовой белок, что объясняется ростом спроса на заменители кормового белка<sup>1</sup>. Основными конкурентами кормового белка выступают более дешёвые соевый и подсолнечный шрот, рыбная мука.

Вследствие того, что белки сои хорошо сбалансированы по аминокислотному составу и их содержание в семенах достигает 35 - 40 %, эта культура имеет важное значение как дешёвый источник пищевого и кормового белка. До второй мировой войны 80 – 90 % всего мирового производства сои приходилось на Китай. КНР оставалась ведущей соепроизводящей державой до 50-х годов, когда первенство перешло к США. Вторым крупным производителем является Бразилия, третье место занимает КНР, четвертое - Аргентина<sup>2</sup>. На сегодняшний день только две культуры в мире способны удовлетворять потребности в белке современного животноводства – соя и люпин<sup>3</sup>. В России возделывание сои ограничено вследствие неблагоприятных климатических условий. Однако ведётся поиск других источников полноценного белка, одним из которых может стать люпин. Важным в этом направлении является расширение посевов других зернобобовых культур,

---

<sup>1</sup> Анализ рынка кормового белка в России в 2007 - 2011 гг, прогноз на 2012-2016 гг : демонстрационная версия отчета / BusinesStat // РБК - Исследования рынка, готовые маркетинговые исследования и на заказ, маркетинговый план, бизнес-планы [Электронный ресурс] / РосБизнесКонсалтинг. – Электрон. текстовые и граф. дан. – М., 2012. – Режим доступа : <http://marketing.rbc.ru/research/562949983244233.shtml>. - Заглавие с экрана.

<sup>2</sup> Подобедов, А.В. Мировое производство сои / А.В. Подобедов, В.И. Тарушкин // Информационный бюллетень «КАРО». – 1999. - № 11-12. – 12 с.

<sup>3</sup> Чекмарев, П.А. Рациональные подходы к решению проблемы белка в России / П.А. Чекмарев, А.И. Артюхов // Достижения науки и техники АПК. – 2011. - № 6. – С. 5 – 8.

которые так же, как и соя, способны накапливать в зерне большое количество белка (25 - 35 %), имеющего высокую биологическую ценность<sup>1</sup>.

В качестве альтернативы рыбной муке может выступать производство микробного и дрожжевого кормового белка. Однако, традиционные ресурсы для производства дрожжевого белка – растительное и углеводородное сырье (парафины нефти) ограничены и уже сегодня не позволяют обеспечить востребованные рынком объемы производства.

Одним из путей решения проблемы кормового белка является получение его микробиологическим путем<sup>2</sup>. При этом продуцентами белка служат дрожжи, бактерии, низкие и высшие грибы и одноклеточные водоросли. Микроорганизмы отличаются высоким (до 60 % сухой массы) содержанием белка, сбалансированного по аминокислотному составу. Кроме того, микроорганизмы содержат углеводы, липиды, витамины, макро- и микроэлементы<sup>3</sup>. Важным достоинством производства кормового белка на основе микроорганизмов является использование сельскохозяйственных отходов, возможность организации промышленного производства, отсутствие сезонности и зависимости от погодных-климатических условий<sup>4</sup>.

Одним из главных факторов, ограничивающим переработку целлюлозосодержащего растительного сырья биотехнологическими методами с последующим получением белковых продуктов, по мнению Панфилова В.И. (2004), является невысокая рентабельность этих производств, обусловленная недостатками подготовки сырья (низкая технологичность узла кислотного гидролиза, образование большого количества отходов, в т.ч. лигнина), высокими энергозатратами, низким выходом целевого продукта, низкой экологичностью всего процесса. В работах В.А. Быкова (1985), М.Н. Манаква

---

<sup>1</sup> Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / 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.

<sup>2</sup> Мхитарян, Г.А. Современные технологии переработки свекловичного жома / Г.А. Мхитарян, А.П. Леснов, В.М. Ткаченко // Сахарная свекла. – 2009. – № 2. – С. 33 – 35.

<sup>3</sup> Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use / F. Bourdichona, S. Casaregolab, C. Farrokh [and others] // International Journal of Food Microbiology. – 2012. – Vol. 154, № 3. – p. 87 – 97.

<sup>4</sup> Chadd, S.A. Practical production of protein for food animals / S.A. Chadd, W.P. Davies, J.M. Koivisto // Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 29 April – 3 May 2002. – 2004. - № 1. – p. 77 – 125.

и Победимского Д.Г. (1990) в частности, было показано, что проведение глубинного культивирования дрожжей в присутствии не утилизируемой твердой фазы (лигнин, целлолигнин) позволяет в определенных условиях повысить фильтруемость микробных суспензий. В этом случае получаемый продукт представляет собой растительный углеводно-белковый корм (РУБК), содержащий помимо дрожжевого белка, не утилизируемый дрожжами лигнин или целлолигнин, наличие которых улучшает усвоение кормов и перистальтику кишечника животных.

Таким образом, относительно проблемы получения белковых продуктов, представляется актуальным последующее развитие технологий биотехнологической переработки целлюлозосодержащего растительного сырья, обращенных на увеличение их эффективности и экологической безопасности<sup>1</sup>.

## **1.2. Растительное сырьё в качестве источника кормового протеина**

Одним из путей решения проблемы кормового белка в животноводстве является использование в качестве корма растительных культур, содержащих большое количество белка.

Обстоятельный анализ проблемы производства растительного белка, проведенный Р. Карлсоном<sup>2</sup>, позволил ему сделать вполне обоснованный вывод о том, что традиционные сельскохозяйственные культуры, оставаясь главным источником растительного белка в пищевом и кормовом балансе, не в состоянии удовлетворить быстро растущих в нем потребностей, и, следовательно, необходимо искать альтернативные источники<sup>3</sup>.

По мнению В.В. Киреевой среди наиболее распространенных сеяных трав, овощных и овощебахчевых культур особого внимания заслуживает фитомасса люцерны посевной, амаранта метельчатого и ботва столовой

---

<sup>1</sup> Панфилов, В.И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дис. ... д-ра техн. наук : 03.00.23 / В. И. Панфилов ; РГБ ОД. – М., 2004 - 371 с.

<sup>2</sup> Carlsson, R. Amaranth species and related species for leaf protein concentrate production / R. Carlsson // Proceedings of 1st Amaranth conf., Rodale Press Inc., Emmaus. – 1977. – P. 83 – 99.

<sup>3</sup> Чернов, И.А. Специфика биосинтеза высоколизинового белка у растений рода *Amaranthus* L., состав, свойства и технология его выделения из фитомассы амаранта / И.А. Чернов, Г.А. Гасимова, И.А. Дегтярёва, Ю.А. Куликов // Ученые записки казанского государственного университета. Естественные науки. – 2007. – Т. 149, кн. 4. – С. 8 – 19.

свёклы<sup>1</sup>. Однако не стоит забывать о таких высокопродуктивных культурах как кукуруза и люпин.

Возделывание ультрараннеспелых гибридов кукурузы обеспечивает получение качественного сырья с высоким выходом кормовых единиц. Однако зелёная масса кукурузы, как и других одновидовых посевов, не сбалансирована по содержанию переваримого протеина. Пути решения этой задачи являются смешанные посевы кукурузы с культурами, богатыми белком, а именно зернобобовыми – горох, вика, фасоль, соя, люпин и др.<sup>2</sup>.

Современное животноводство интересуют белковые добавки с содержанием протеина не менее 35 %. На сегодняшний день в мире есть только две культуры способные удовлетворять такую потребность – это соя и люпин. Для Американского континента с теплым муссонным климатом больше подходит соя, а для холодных континентальных условий России – люпин<sup>3</sup>. По своему качеству белок люпина, согласно принятым Международным стандартам, равнозначен для комбикормовой и пищевой промышленности белку сои. Коэффициент переваримости люпина составляет 80-89%, сои - 76-84%, а коэффициент биологической ценности люпина - 67-78% и сои 64-80% (колебания с учетом сортовых особенностей)<sup>4</sup>. Таким образом, кукурузо-люпиновые посевы – это перспектива будущего развития кормовой базы животноводства, которая требует минимум энергозатрат, имеет низкую себестоимость, мало зависит от природно-климатических условий, что очень важно в условиях нашей страны, которая сбалансирована по количеству белка и аминокислот на кормовую единицу<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Киреева, В.В. Технология комплексной переработки вегетативной массы растений с получением продуктов пищевого и кормового назначения / В.В. Киреева // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Приложение. - 2004. - № 6. - С. 46 - 50.

<sup>2</sup> Пындак, В.И. Смешанные кукурузо-люпиновые посевы: проблемы и перспективы / В.И. Пындак, А.Е. Новиков // «Успехи современного естествознания». – 2007. - № 7. – С. 58 – 59.

<sup>3</sup> Чекмарев, П.А. Рациональные подходы к решению проблемы белка в России / П.А. Чекмарев, А.И. Артюхов // Достижения науки и техники АПК. – 2011. - № 6. – С. 5 – 8.

<sup>4</sup> Ващекин, Е.П. Повышение полноценности кормления крупного рогатого скота / Е.П. Ващекин // Вестник брянской государственной сельскохозяйственной академии. – 2009. - № 6. – С. 11 – 17.

В качестве еще одного альтернативного источника кормового протеина может использоваться перспективная высокобелковая культура амарант (*Amaranthus L.*).

В последние годы во многих странах мира проводятся интенсивные исследования с этой культурой. Семена и фитомасса амарантовых представляют собой прекрасный корм для животных в свежем, сушеном или заsilосованном состоянии, а также высокотехнологичное сырье для извлечения белка и сопутствующих ценных компонентов, таких как пектин, пигменты, витамины, пищевые красители и др. Семена амаранта содержат в среднем 15 – 18 % белка, 5 – 8 % масла и 3,7 – 5,7 % клетчатки, что выше, чем у большинства зерновых культур<sup>1</sup>.

Амарант устойчив против болезней, засухи, жары. Хорошо приспосабливается к новым условиям, в том числе и таким, которые для других растений невыносимы. Семейство амарантовых представлено 65 родами и 850 видами, распространёнными главным образом в субтропических областях земного шара. Все они являются древними зерновыми культурами<sup>2</sup>.

Именно поэтому за последние 25 лет многие виды амаранта интродуцируются и широко используются в качестве пищевых, кормовых и лекарственных культур в странах Америки, Европы, Азии и Африки<sup>3</sup>.

В отличие от низкокачественных белков зерновых злаков, ценность белка амаранта определяется преобладанием легкорастворимых в воде и слабых солевых растворах фракций альбуминов и глобулинов, не образующих клейковины, с повышенным содержанием незаменимых аминокислот<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> Магомедов, И.М. Физиологические особенности конкурентоспособности амаранта / И.М. Магомедов // Успехи современного естествознания. – 2008. - № 5. – С. 41 – 43.

<sup>2</sup> Алексеев Г.В. Переработка нетрадиционного растительного сырья с целью дальнейшего его использования в продуктах питания / Г.В. Алексеев, В.А. Головацкий, И.В. Краснов [и др.] // Электронный научный журнал процессы и аппараты пищевых производств [Электронный ресурс] / СПб НИУ ИТМО ИХиБТ. – Электрон. текстовые дан. – С-Петербург : СПбГУНиПТ, 2007. – Режим доступа : <http://processes.open-mechanics.com/articles/29.pdf>. - Заглавие с экрана.

<sup>3</sup> Журавель, Н.В. Амарант - перспективная зернокармливая культура для возделывания на юге России / Н.В. Журавель, В.В. Чумакова // Зерновое хозяйство России. – 2012. - № 2. – С. 18 – 25.

<sup>4</sup> Чернов, И.А. Специфика биосинтеза высоколизинового белка у растений рода *Amaranthus L.*, состав, свойства и технология его выделения из фитомассы амаранта / И.А. Чернов, Г.А. Гасимова, И.А. Дегтярёва, Ю.А. Куликов // Ученые записки казанского государственного университета. Естественные науки. – 2007. – Т. 149, кн. 4. – С. 8 – 19.

Ещё одним источником пополнения кормовой базы может выступать свекловичный жом. Это стружка толщиной не более 2 мм с влажностью около 70%, из которой извлечено основное количество сахара. Высушенный продукт содержит: протеина 7 - 9 %, клетчатки 19 – 23 %, безазотистых экстрактивных веществ 55 – 65 %, жира 0,3 - 0,5 %<sup>1</sup>. Сухой свекловичный жом по биохимическому составу можно сравнить с пшеничными отрубями. Особенность жома заключается в том, что он обладает пробиотическим действием за счет большого содержания пектиновых веществ. Пектины нормализуют работу пищеварительного тракта у животных, вследствие чего они потребляют меньше корма<sup>2</sup>.

Улучшить качественные показатели свекловичного жома возможно за счет твердофазной биоферментации при понижении содержания клетчатки и увеличении количества протеина в жоме<sup>3</sup>.

В 2008 году на площадке Шебекинского биохимического завода (ШБХЗ) Белгородской области были проведены эксперименты по определению пригодности использования твердофазной биоферментации жома и получения результатов после ферментации свекловичного жома. Результаты показали снижение клетчатки на 18%, а рост протеина на 125% при одновременном повышении энергетической ценности в нативном сырье, обогащении витаминами, увеличении белковой составляющей при параллельном разрушении клетчатки в нативном свекловичном жоме<sup>4</sup>.

### **1.3. Микробный синтез в производстве кормового белка**

Многие микроорганизмы способны к интенсивному синтезу белков, при этом белки микробных клеток содержат большое количество незаменимых аминокислот. Эти микроорганизмы можно использовать в качестве

---

<sup>1</sup> Леснов, А.П. Инновационные разработки производства белковых кормов из свекловичного жома / А.П. Леснов, Г.А. Мхитарян, О.П. Леснова [и др.] // Эффективное животноводство. – 2009. - № 3. - С. 16 – 17.

<sup>2</sup> Мхитарян, Г.А. Современные технологии переработки свекловичного жома / Г.А. Мхитарян, А.П. Леснов, В.М. Ткаченко // Сахарная свекла. – 2009. - № 2. – С. 33 – 35.

<sup>3</sup> Леснов, А.П. Переработка свекловичного жома в высокобелковые корма / А.П. Леснов // Сахар. – 2010. - № 8. – С. 2 – 5.

<sup>4</sup> Леснов, А.П. Инновационные разработки производства белковых кормов из свекловичного жома / А.П. Леснов, Г.А. Мхитарян, О.П. Леснова [и др.] // Эффективное животноводство. – 2009. - № 3. - С. 16 – 17.

концентрированных кормовых добавок, не уступающих по биологической ценности белков соевому шроту или рыбной муке.

Микроорганизмы обладают некоторыми преимуществами в качестве продуцентов кормового белка относительно растительных, а в некоторых случаях, и животных организмов. Они отличаются высоким (до 60 % сухой массы) содержанием белков, тогда как в растениях концентрация белковых веществ значительно варьирует в зависимости от условий выращивания, климата, погоды, типа почвы, агротехники и др.<sup>1,2</sup>. Наряду с белками в микробных клетках образуются и другие ценные в питательном отношении вещества: легкоусвояемые углеводы, липиды с повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот, витамины, макро- и микроэлементы<sup>3</sup>.

Микроорганизмы чрезвычайно широко распространены в природе: в воздухе, воде рек, озер и горячих ключей, во льдах, в почве тропических и полярных стран. Однако состав микрофлоры в зависимости от условий обитания различен<sup>4</sup>.

Факторы, определяющие целесообразность с экономической точки зрения и перспективы использования микроскопических организмов в биотехнологической промышленности:

1. Широкий спектр сырья, которое может быть использовано для выращивания микроорганизмов, включая неиспользуемые отходы сельскохозяйственного производства;
2. Способность к усиленному синтезу протеинов;
3. Доступная технология выращивания микроорганизмов и возможность их культивирования в любое время года и суток;

---

<sup>1</sup> Murray, M.Y. Fermentation of cellulosic materials to mycoprotein foods / M.Y. Murray, Y. Chisti, D. Vlach // *Biotechnology Advances*. – 1993. - № 11. – p. 469 – 479.

<sup>2</sup> Bisaria, R. Mushrooms: Potential protein source from cellulosic residues / R. Bisaria, M. Madan // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1983. – Vol. 5, № 4. – P. 251 – 259.

<sup>3</sup> Зельцер, А.М. Кормовая ценность грибного мицелия / А.М. Зельцер, А. Горев, А.В. Медведев // *Зоотехния*. – 2000. - № 6. – С. 21 – 22.

<sup>4</sup> Гусев, М.В. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 4-е изд., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.

4. Микроорганизмы отличаются наличием в их составе большого количества ценных веществ, таких как витамины, аминокислоты, протеин, липиды и др.;
5. Осуществимость изменения микроорганизмов на генном уровне в нужном направлении с целью улучшения их биохимического состава.

Применение микроорганизмов позволяет организовать промышленное производство кормовых концентратов на ограниченной площади и получать большое их количество независимо от времени года, причем микробные клетки способны синтезировать белки из отходов сельского хозяйства и промышленности и, таким образом, позволяют одновременно решать другую важную проблему — утилизацию этих отходов в целях охраны окружающей среды<sup>1,2</sup>.

Микробный синтез характеризуется чрезвычайной интенсивностью. Например, растения сои массой 500 кг в фазе созревания семян способны в сутки синтезировать 40 кг белков, бык такой же массы — 0,5 — 1,5 кг, а дрожжевые клетки массой 500 кг — до 1,5 т белков. В качестве источников кормового белка наиболее часто используются различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, белковые коагуляты травянистых растений<sup>3</sup>.

При использовании микроорганизмов в качестве продуцентов целлюлолитических ферментов и кормового белка одновременно решаются две важные задачи — получение белковой массы и утилизация отходов растениеводства, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, которые могут быть источниками загрязнения окружающей

---

<sup>1</sup> Князева, И.А. Разработка биоконверсии отходов переработки зерна в белковые кормовые препараты путем твердофазной и глубинной ферментации их с помощью дрожжевых микроорганизмов : автореферат дис. ... кандидата технических наук : 03.00.23 / И.А. Князева ; Моск. гос. акад. пищевых производств. — М., 1996. — 24 с.

<sup>2</sup> Биотехнологическая переработка отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности / М.М. Шамцян, Б.С. Колесников, А.А. Клепиков [и др.] // Российский химический журнал. — 2011. — Т. LV, № 1. — С. 17 — 25.

<sup>3</sup> Панфилов, В.И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дис. ... д-ра техн. наук : 03.00.23 / В. И. Панфилов ; РГБ ОД. — М., 2004 - 371 с.

среды<sup>1,2,3</sup>. Целенаправленное использование микроорганизмов способствует получению стабильного качества БАВ. Технологическое действие микроорганизмов связано с образованием специфических биологически активных компонентов: органических кислот, бактериоцинов, ферментов, витаминов и пр., что способствует улучшению санитарно-микробиологических, органолептических показателей готового продукта<sup>4</sup>.

Важной задачей является поиск активных штаммов микроорганизмов, способных перерабатывать лигнин, обладающий высокой устойчивостью к разложению микрофлорой. В настоящее время подобраны быстрорастущие штаммы грибов для промышленного культивирования из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*<sup>5</sup>. Данные грибы состоят из клеток с неплотной клеточной стенкой, что благоприятно сказывается на переваримости мицелия и продуктов на его основе.

По сравнению с дрожжевыми, белки микроскопических грибов отличаются повышенным содержанием серосодержащих аминокислот и лучшей усвояемостью. Концентрация нуклеиновых кислот в грибном мицелии (1 – 4 % от сухой массы) почти такая же, как в тканях растительного организма. В то же время в биомассе грибов синтезируется значительно меньше белков (20 – 60 % от сухой массы), чем в дрожжах, и у них относительно медленней происходит рост биомассы<sup>6</sup>.

---

<sup>1</sup> Базунова, М.В. Способы утилизации отходов полимеров / М.В. Базунова, Ю.А. Прочухан // Вестник башкирского университета. – 2008. – Т. 13, № 4. – С. 875 – 885.

<sup>2</sup> Пат. 2354633 Российская федерация, МПК С 05 F 11/08, С 02 F 3/34 . Способ утилизации жиросодержащих отходов и продукт, получаемый этим способом / Н.С. Фунтикова, Н.Б. Сократова, М.С. Тришкин ; заявители и Н.С. Фунтикова, Н.Б. Сократова, М.С. Тришкин. – № 2007124272/13 ; заявл. 28.06.2007 ; 10.05.2009, Бюл. № 13. – 6 с.

<sup>3</sup> Doelle, H.W. Microbial cultures in the utilization of cellulosic materials / H.W. Doelle // Biotechnology Advances. – 1984. – Vol. 2, № 1. – p. 1 – 19.

<sup>4</sup> Павловская, Н.Е. Получение БАВ из соломы биотехнологическим методом / Н.Е. Павловская, И.В. Горькова, И.А. Гнеушева, В.Н. Дедков // Инновации аграрной науки и производства: Материалы Международной научно-практической конференции 14-15 декабря 2011 года. Сборник статей. – Орел : Изд-во Орел ГАУ, 2011. - С. 124 – 127.

<sup>5</sup> Дедков, В.Н. Биоконверсия соломы злаковых культур грибами рода *trichoderma* в кормовые продукты для животноводства / В.Н. Дедков, И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская // Вестник ОрелГАУ. – 2012. – №4(37). – С. 102 – 105.

<sup>6</sup> Гореликова, Г.А. Основы современной пищевой биотехнологии: Учебное пособие / Г.А. Гореликова. – Кемерово : Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2004. – 100 с.

Низшие 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<sup>1,2</sup>.

В целях ускорения роста грибов проводится предварительная обработка растительного сырья, повышающая доступность его компонентов для утилизации микроорганизмами<sup>3</sup>. Чаще всего применяют кислотно-щелочной способ обработки целлюлозо- и лигнинсодержащих отходов, отпаривание под давлением, обработка аммиаком и каустической содой<sup>4,5</sup>. После такой обработки происходит полное или частичное разложение трудногидролизуемых полисахаридов и лигнина, что обеспечивает ускоренный рост грибной массы и сокращение сроков промышленного культивирования грибов (до 7 - 8 суток)<sup>6</sup>.

В зависимости от способа подготовки растительного сырья для культивирования микроскопических грибов применяют и соответствующие технологии их выращивания. Для культивирования грибов на твердой питательной среде разработан метод твердофазной ферментации. Это гетерофазный процесс, который включает измельчение и обработку растительного сырья парами воды и аммиака, обогащение этого сырья минеральными веществами, посев и выращивание мицелия грибов в заданном режиме аэрации и поддержание оптимальной температуры<sup>7</sup>.

---

<sup>1</sup> Tonozuka, T. Enzymes for Cellulosic Biomass Conversion / T. Tonozuka, M. Yoshida, M. Takeuchi // Tojo, S. Research Approaches to Sustainable Biomass Systems / S. Tojo. – Waltham : Academic Press, 2014. – Chapter 9. – P. 225 – 242.

<sup>2</sup> Борисенков, М.Ф. Действие ферментов на солому злаков / М.Ф. Борисенков, А.А. Шубаков, Л.С. Кочева [и др.] // Химия растительного сырья. – 2011. - № 4. – С. 19 – 23.

<sup>3</sup> Низкотемпературный гидролиз растительного сырья / Р.М. Нуртдинов, Р.Т. Валеева, С.Г. Мухачев [и др.] // Вестник казанского технологического университета. – 2011. - № 15. – С. 150 – 153.

<sup>4</sup> Высокотемпературный гидролиз растительного сырья // Р.М. Нуртдинов, С.Г. Мухачев, Р.Т. Валеева [и др.] // Вестник казанского технологического университета. – 2011. - № 10. – С. 204 – 208.

<sup>5</sup> Голязимова, О.В. Увеличение эффективности измельчения лигноцеллюлозного растительного сырья с помощью химической обработки / О.В. Голязимова, А.А. Политов, О.И. Ломовский // Химия растительного сырья. – 2009. - № 2. – С. 53 – 58.

<sup>6</sup> Денисова, М.Н. Нейтральный способ получения целлюлозы из плодовых оболочек злаков / М.Н. Денисова // Ползуновский вестник. – 2011. - № 4(1). – С. 239 – 243.

<sup>7</sup> Смирнов, К.А. Особенности твердофазной ферментации / К.А. Смирнов, Ю.Д. Алашкевич, Н.С. Решетова // Химия растительного сырья. – 2009. - № 3. – С. 161 – 164.

Этот способ привлекателен, прежде всего, из-за низкого энергопотребления, высокого выхода конечного продукта и уменьшения количества сточных вод, что снижает риск бактериального заражения окружающей среды. Кроме того, он является экологически чистым, так как в основном использует твердые агропромышленные отходы в качестве субстрата (источника углерода)<sup>1</sup>. Однако, при такой технологии культивирования грибов коэффициент использования растительного сырья невысокий, что предопределяет и сравнительно невысокий уровень содержания белка в выращиваемой грибной массе (20 – 30 % от сухой массы). Так, прямое культивирование низших мицелиальных грибов на соломе и других отходах растениеводства обеспечивает включение углерода из этих источников в органическое вещество грибного мицелия на 17 – 25 %.

Более высокий коэффициент использования сырья обычно достигается при выращивании грибов на гидролизатах растительных отходов и жидких отходах деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности<sup>2</sup>. В пересчете на сухую массу количество протеина в грибном мицелии, культивируемом на среде с высокой влажностью, может составлять 50 – 60 %. Для более эффективной переработки сырья в некоторых случаях применяется одновременное культивирование бактерий и грибов. Разработаны технологии по переработке в грибной белок торфа, навоза<sup>3</sup>.

Хорошая переваримость грибной белковой массы в организме животных, а также низкий уровень содержания нуклеиновых кислот позволяют использовать её в качестве кормовой добавки в значительно большей концентрации, чем кормовые дрожжи. Обычно при кормлении молодняка животных допускается введение в кормовые рационы грибного белка в

---

<sup>1</sup> Thomasa, L. Current developments in solid-state fermentation / L. Thomasa, C. Larrocheb, A. Pandey // *Biochemical Engineering Journal*. – 2013. - № 81. – P. 146 – 161.

<sup>2</sup> Егорова, Т.А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – 4-е изд., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 208 с.

<sup>3</sup> Пат. 2005789 Российская Федерация, МПК С 12 Р 1/00 А, С 02 F 3/34 В. Способ очистки животноводческих стоков и получение биомассы / М.В. Левчикова, Р.А. Мельник, Л.И. Ульченко, А.А. Ковалев ; заявитель и патентообладатель «Всероссийский институт электрофикации сельского хозяйства». - № 4856861/13 ; заявл. 26.06.1990 ; 15.01.1994, Бюл. № 1. – 6 с.

пределах 15 – 20 % от белка корма, а при кормлении взрослых животных - до 50 %.

### *Кормовые дрожжи*

Кормовой дрожжевой белок (комовые дрожжи, кормовой белок) в качестве кормовой добавки в животноводстве стали широко применять со второй половины XX в. Он существенно повышает биологическую ценность кормов, прежде всего за счет содержащихся в нем незаменимых аминокислот и витаминов<sup>1</sup>.

В нашей стране производство кормовых дрожжей было начато в середине 1930-х гг. Отходы сельскохозяйственных производств такие как солома, кукурузные кочерыжки, опилки, подвергали гидролизу серной кислотой, гидролизаты нейтрализовали и использовали для выращивания дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Однако транспорт сырья на такие заводы оказался дорогостоящим и поэтому они обладали малой мощностью и имели лишь местное значение<sup>2</sup>.

Кормовые дрожжи - высокоценный белково-витаминный продукт. Микробный протеин, синтезируемый дрожжами, по усвояемости и содержанию аминокислот, превосходит протеин животного происхождения, повышает биологическую ценность белков других кормов. Белок кормовых дрожжей переваривается в организме животных на 95 %. Сера и ее соединения, входящие в состав, участвуют в биологических процессах образования аминокислот. Ферментные системы дрожжей катализируют процессы усвоения аминокислот и синтеза белка. Фосфор и кальций, находящийся в составе дрожжей, способствуют нормальному развитию костного скелета. Витамины группы В, входящие в состав дрожжей, являются регуляторами метаболизма

---

<sup>1</sup> Брызгалов, Л.П. Производство кормовых дрожжей / Л.П. Брызгалов, А.А. Андреев. - М. : Лесная промышленность, 1965. – 278 с.

<sup>2</sup> Панфилов, В.И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дис. ... д-ра техн. наук : 03.00.23 / В. И. Панфилов ; РГБ ОД. – М., 2004 - 371 с.

жиров. Противопоказаний к применению кормовых дрожжей не имеется. Передозировка кормовых дрожжей не вызывает побочных явлений<sup>1</sup>.

В качестве штаммов-продуцентов кормового белка используют микроскопические грибы родов *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* и др. они представляют собой одноклеточные микроорганизмы (грибы), способные развиваться в питательной среде, которая содержит источники углеводного и минерального питания (N, P, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Zn и т.д.), а также растворенный кислород. В процессе роста биомассы в дрожжевой клетке происходит ферментативный синтез белка<sup>2</sup>.

В качестве исходного сырья при такой технологии получения кормового белка обычно используются отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, хлопковая шелуха, корзинки подсолнечника, льняная костра, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, виноградные выжимки, пивная дробина, верховой малоразложившийся торф, барда спиртовых производств, отходы пищевой промышленности и др.

Для компенсации недостающих ресурсов белкового сырья предстоит более широко использовать вторичные ресурсы перерабатывающей, пищевой, микробиологической и химической промышленности. Речь идет об увеличении производства шротов, особенно рапсового, рациональном использовании остатков бродильных производств (барды, пивной дробины и др.), молочной и мясной промышленности. Более широко планируется использовать достижения биотехнологии, в частности, продукции микробиального синтеза: аминокислот, кормовых дрожжей.

Для ферментативной обработки целлюлозосодержащего сырья и получения микопротеина могут использоваться грибы рода *Fusarium*.

Большинство грибов этого рода — фитотрофы (возбудители заболеваний растений). Фузариумы одного вида могут поражать растения из самых

---

<sup>1</sup> The Yeasts : A Taxonomic Study / Edited by C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout. – Philadelphia : Elsevier, 2011. – Fifth edition. – 2100 p.

<sup>2</sup> Подобед, Л.И. На каких дрожжах растет птица / Л.И. Подобед // Животноводство России. – 2007. - № 4. – С. 21 – 22.

разнообразных семейств, вызывая у них различные патологические явления — гниль корней, семян, плодов, а также общее угнетение и преждевременное увядание. Тип проявления болезни зависит, с одной стороны, от видовой принадлежности патогенов, а с другой, от экологических условий, в которых они развивались. К наиболее распространенным фузариозным заболеваниям относятся гниль корней и трахеомикозное сосудистое увядание растений<sup>1</sup>.

Наиболее распространенными возбудителями корневой гнили многих культур (например, гороха, фасоли, огурцов, дыни, арбузов, томатов) являются такие виды, как *F. avenaceum*, *F. solani*, *F. culmorum*, *F. gibbosum*, *F. semitectum*, *F. javanicum*, *F. heterosporum*, *F. Oxysporum* и др. Заболевание чрезвычайно широко распространено и поражает самые разнообразные культуры (пшеница, рожь, рис, бобы, горох, соя, люцерна, дыня, арбуз). Его также считают одним из вредоноснейших заболеваний льна и хлопчатника. У последнего при поражении, кроме симптомов, описанных выше, на листьях образуются желтые жилки, а участки тканей между ними остаются зелеными, отчего лист становится сетчатым. Фузариозное увядание картофеля также довольно распространенное заболевание на юге и юго-востоке нашей страны<sup>2</sup>. Грибы рода фузариум могут продуцировать биологически активные вещества, которые применяют в сельском хозяйстве. Например, свойство гриба *F. moniliforme* оказывать стимулирующее действие на рост растений было использовано для получения стимулятора роста — гиббереллина<sup>3</sup>.

Известно, что микроскопические грибы рода *Fusarium* способны активно участвовать в деструкции лигноцеллюлозных компонентов растительного сырья. Возможность освоения субстрата, степень его трансформации, морфологические параметры роста, интенсивность спорообразования гриба тесно связаны с природой субстрата и степенью его подготовки<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> Кирик Н.Н. Болезни корневой системы растений / Н.Н. Кирик, М.И. Пиковский // Настоящий хозяин. – 2012. - № 10. – С. 6 – 12.

<sup>2</sup> Гагкаева, Т.Ю. Фузариоз зерновых культур / Т.Ю. Гагкаева, О.П. Гаврилова, М.М. Левитин [и др.] // Приложение к журналу «Защита и карантин растений». – 2011. - № 5. – 52 с.

<sup>3</sup> Жизнь растений. В 6 т. Т. 2 : Грибы / Под. ред. М.В. Горленко. – М. : Просвещение, 1976. – 479 с.

<sup>4</sup> Ускова, А.В. Влияние физико-химических и микробиологических методов обработки вегетативной части топинамбура на целлюлозу / А.В. Ускова, М.А. Пикозина // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки : сб. ст. студентов, аспирантов и молодых ученых по итогам Вс. н.-практ. конф. посв. 80-летию

Другим продуцентом кормового белка и ферментов являются грибы рода *Trichoderma*.

Представителей рода *Trichoderma* можно найти практически во всех почвах. В настоящее время перед микологами, изучающими *Trichoderma*, стоит задача поиска в природе новых видов-продуцентов, которые еще могут быть найдены, и их использования в промышленности. Для этого исследуются почвы как хранители ценных природных изолятов<sup>1</sup>.

Виды *Trichoderma* являются продуцентами ферментов (целлюлаз, хитиназ, пектиназ, ксиланаз, серинзависимых протеиназ и др.), используемых в целлюлознобумажной и пищевой промышленности, в производстве моющих средств, в получении спирта, преобразовании отходов, содержащих целлюлозу в глюкозу и для биологического контроля болезней и стимуляции роста растений<sup>2</sup>.

Ферментные препараты, способные разрушать целлюлозу находят широкое применение в самых разных отраслях производства. Мировое производство целлюлаз составляет тысячи тонн. Использование целлюлаз позволяет применять безотходные технологии. Гидролиз целлюлозы дает глюкозу, которую можно использовать для производства пищевых и кормовых белковых препаратов, получать из нее спирт для энергетических целей. Целлюлолитические ферменты с успехом применяют в самых различных производствах, где сырьем являются растительные материалы или отходы переработки растений<sup>3</sup>.

Наиболее полно изучен продуцент *Trichoderma reesei*, способный разрушать нативную целлюлозу. Однако этот штамм, не смотря на

---

Сибирского гос. технол. университета / ГОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет». – Красноярск, 2010. – С. 28 – 31.

<sup>1</sup> Алимova, Ф.К. Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф.К. Алимova, Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова // Учебно-методическое пособие. - Казань: УНИПРЕСС ДАС, 2007. – 234 с.

<sup>2</sup> Алимova, Ф.К. Использование *Trichoderma* в процессе переработки отходов спиртового производства / Ф.К. Алимova, Е.В. Скворцов, Т.А. Мельникова [и др.] // Вестник биотехнологии. – 2007. - № 3. – С. 22 – 26.

<sup>3</sup> Волова, Т.Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова. – Электрон. дан. (2 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – (Введение в биотехнологию : УМКД № 143-2007 / рук. творч. коллектива Т. Г. Волова). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования : Intel Pentium (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 2 Мб свободного дискового пространства ; привод DVD ; операционная система Microsoft Windows 2000 SP 4 / XP SP 2 / Vista (32 бит) ; Adobe Reader 7.0 (или аналогичный продукт для чтения файлов формата pdf).

внеклеточную продукцию фермента, производит не самый эффективный целлюлазный комплекс. В результате 40 летних обширных поисков было найдено около 60 продуцентов целлюлаз. Грибы, такие как *Humicola*, *Aspergillus* и *Penicillium*, бактерии, такие как *Cellulomonas*, *Pseudomonads* и актиномицеты – *Streptomyces* применяются для производства целлюлазы. *Penicillium*, *Aspergillus* и *Humicola* гидролизуют нативную клетчатку<sup>1</sup>.

В коммерческом производстве целлюлаз в настоящий момент наиболее распространенным методом получения является глубинное культивирование. Однако поверхностное культивирование обеспечивает более оптимальные условия для роста аэробных микроскопических грибов<sup>2</sup>.

При промышленном производстве целлюлаз применяют традиционную схему выделения ферментов: экстракция водой водорастворимой части культуры; стабилизация целлюлаз в растворе некоторыми солями; осаждение целлюлаз или их частичное фракционирование органическими растворителями; высушивание влажных осадков.

В настоящее время существуют два основных способа использования ферментных препаратов при кормлении с/х животных: введение их непосредственно в рацион и обработка кормов ферментными препаратами. В связи с тем, что основные ингредиенты рациона состоят из растительного белка, целлюлозы, крахмалистых веществ, целесообразно применять препараты, расщепляющие их. Такие ферменты, как протеаза, амилаза, целлюлаза и их комбинации гидролизуют белки, крахмал, клетчатку и способствуют лучшему усвоению их организмом животных, усиливают и нормализуют процессы пищеварения. В животноводстве целесообразно использовать ферменты, синтезируемые микроорганизмами, обитающими в

---

<sup>1</sup> Harikesh, B.S. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix / B.S. Harikesh, N.S. Brahma, P.S. Satyendra, S.N. Chandra // *Bioresource Technology*. – 2010. - № 101 (16). – p. 6444 – 6453.

<sup>2</sup> Patel N. Growth of *Trichoderma reesei* RUT C-30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors / N. Patel, V. Choy, P. Malouf, J. Thibault // *Process Biochemistry*. – 2009. - № 10. – p. 1164 – 1171.

рубце животных. Они отобраны природой и гидролизуют компоненты пищи, входящие в рацион<sup>1</sup>.

### 1.3.1. Целлюлолитические ферменты и механизм их действия

Субстратом для целлюлолитических ферментов является целлюлоза. В работе продуцентами этих ферментов являются грибы *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma harzianum*. Они широко распространены в природе.

Для более эффективного гидролиза целлюлозы можно использовать комплекс ферментов<sup>2</sup>. Целлюлазный комплекс содержит 4 группы ферментов:

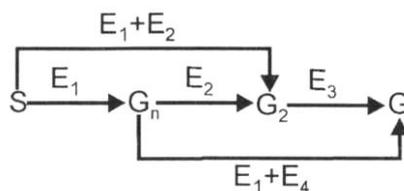
1. эндоглюканаза - 1,4-β-D-глюкан-4-глюкогидролаза (КФ 3.2.1.4), которая может неупорядочно гидролизовать в целлюлозе и в р-глюканах зерна р-1,4-связи и образовывать помимо целлоолигосахаридов глюкозу и целлотриозу;

2. экзо-1,4-β-D-глюканцеллобиогидролаза (КФ 3.2.1.91) - целлобиогидролаза, которая отщепляет целлобиозу с нередуцирующих концов целлоолигосахаридов;

3. Р-D-глюкозид-глюкогидролаза (КФ 3.2.1.21) - экзо-Р-глюкозидаза, или целлобиаза, которая гидролизует целлобиозу и отщепляет концевые нередуцирующие остатки Р-D-глюкозы от целлоолигосахаридов;

4. 1,4-β-D-глюкан-глюкогидролаза (КФ 3.2.1.74) - это экзо-1,4-β-глюкозидаза, которая отщепляет глюкозные остатки от нередуцирующих концов целлюлозных субстратов.

Общую схему ферментативного гидролиза комплексом целлюлазных ферментов представляют следующим образом:



<sup>1</sup> Бойко, И.И. Использование ферментных препаратов и грибных культур для улучшения силосуемости и повышения питательной ценности трудносилосующихся и несилосующихся растений : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / И.И. Бойко ; Дубровицы. – М., 1998 – 24 с.

<sup>2</sup> Сушкова, В.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества / В.И. Сушкова, Г.И. Воробьева. – М. : ДеЛи принт, 2008. – 216 с.

где S - исходный субстрат; E<sub>1</sub> - эндоглюканаза; E<sub>2</sub> - целлобиогидролаза; E<sub>3</sub> - целлобиаза; E<sub>4</sub> - экзо-1,4-р-глюкозидаза; G<sub>n</sub> - целлоолигосахариды; G<sub>2</sub> - целлобиоза; G – глюкоза

Целлюлолитическая активность ферментов связана с их способностью адсорбироваться на целлюлозе: чем выше эта способность, тем выше степень ферментативного гидролиза целлюлозы.

Содержание индивидуальных целлюлолитических ферментов в целлюлазных комплексах варьирует в зависимости от их происхождения. В итоге кинетика и выход глюкозы в ходе ферментативного гидролиза целлюлозы для различных препаратов различны. С целью повышения выхода глюкозы необходимо предупредить накопление целлобиозы, которая является ингибитором ферментативной реакции, путем корректировки состава целлюлолитического комплекса - дополнительного введения целлобиазы из другого источника.

#### **1.4. Солома зерновых культур как перспективное сырье для биотехнологической переработки**

Все многообразие сырья, использующегося в промышленных биотехнологических процессах, можно разбить на 4 класса в зависимости от происхождения<sup>1</sup>:

- 1) растительного происхождения;
- 2) животного происхождения (молочная сыворотка, экскременты животных);
- 3) минерального происхождения (нефть, природный газ, уголь - источники получения жидких углеводородов, дизельного топлива, окисленных углеводородов - низших спиртов, газообразных углеводородов);
- 4) биосфера (вода и воздух - источники получения водорода, кислорода, углекислого газа).

---

<sup>1</sup> Сушкова, В.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества / В.И. Сушкова, Г.И. Воробьева – М. : ДеЛи принт, 2008. – 216 с.

Растительное сырье на сегодняшний день является перспективным возобновляемым ресурсом, который может быть использован в качестве субстрата для выращивания микроорганизмов и производства микопротеина<sup>1</sup>. Вместе с тем, для биоконверсии могут использоваться не только сельскохозяйственные культуры, но и отходы растительного происхождения, а также побочные продукты переработки сельскохозяйственного сырья. В этом случае возможно одновременно со снижением дефицита белка в животноводстве утилизировать отходы, загрязняющие окружающую среду<sup>2</sup>.

Возобновляемое растительное сырье представляет большой интерес для промышленной биотехнологии<sup>3</sup>. На Севере и в средней полосе России основные источники возобновляемого сырья - леса (хвойные и лиственные) и возделываемые зерновые культуры. В южных районах России (Кубань, Северный Кавказ) выращивают подсолнечник, кукурузу. В Астраханской области имеется тростник. Большие территории России заняты торфом. Россия имеет огромные ресурсы растительного сырья, что особенно способствует развитию биотехнологии<sup>4</sup>. В силу чрезвычайной распространенности и восполняемости растительные углеводы могут служить прекрасным сырьем для целого ряда производств, в том числе и для микробиологических.

Все растительное сырье можно разбить на 5 групп<sup>1</sup>:

- 1) древесное сырье - побочные продукты лесопиления и деревообработки (щепа, опил, дрова) и продукты лесозаготовки (пни, сучья, вершинки);
- 2) сельскохозяйственное и пищевое сырье - побочные продукты переработки сельскохозяйственного сырья (шелуха, лузга, отруби, барда спиртовых заводов, меласса, рафинадная патока, жмыхи, отходы крахмалопаточных и сахарных заводов); некондиционное зерно, картофель,

---

<sup>1</sup> Xiuzhi, S.S. Isolation and Processing of Plant Materials / S.S. Xiuzhi // Bio-Based Polymers and Composites / W. Richard, S.S. Xiuzhi. – Academic Press, 2005. – Chapter 3. – p. 33 – 35.

<sup>2</sup> Панфилов, В.И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дис. ... д-ра техн. наук : 03.00.23 / В. И. Панфилов ; РГБ ОД. – М., 2004 - 371 с.

<sup>3</sup> Матвеева Н.А. Биохимические особенности свойств и переработки растительного сырья : учебно-методическое пособие / Н.А. Матвеева. – СПб. : НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 16 с.

<sup>4</sup> Сушкова, В.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества / В.И. Сушкова, Г.И. Воробьева – М. : ДеЛи принт, 2008. – 216 с.

травы пряно-ароматические и лекарственные, овощи и фрукты, углеводсодержащие целевые продукты пищевых заводов (сахароза, крахмал, мука соевая и кукурузная и т. д.);

3) недревесное сырье - торф и тростник, искусственно выращенные водоросли;

4) вторичное сырье промышленных предприятий (целлюлозосодержащее): макулатура, отходы текстильной промышленности;

5) отходы и сточные воды предприятий пищевой, целлюлозно-бумажной и микробиологической промышленности, городские отходы. Углеводсодержащее сырье растительного происхождения по химическому составу подразделяют на целлюлозосодержащее, пентозан-содержащее, крахмалсодержащее, сахарсодержащее.

Разнообразие видов растительного сырья, которое может быть использовано для обогащения микробным белком, диктует необходимость дифференцированного подхода к решению проблемы его биоконверсии, исходя из химических и физических свойств сырья, его локализации и экономических предпосылок<sup>1</sup>.

Нами для исследований было выбрано сельскохозяйственное целлюлозосодержащее сырье, в частности солома яровой мягкой пшеницы и гречихи посевной. Данный выбор обоснован актуальными проблемами кормового белка в России и утилизации отходов сельскохозяйственного производства.

В связи со сложившейся ситуацией все более актуальным в животноводстве становится расширение кормовой базы, в частности, использование нетрадиционных энергетических и белковых источников, т.е. повышение питательности малоценного кормового сырья и растительных

---

<sup>1</sup> Панфилов, В.И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дис. ... д-ра техн. наук : 03.00.23 / В. И. Панфилов ; РГБ ОД. – М., 2004 - 371 с.

отходов различных видов, в том числе и соломы как недефицитного отхода полеводства<sup>1</sup>.

Существуют три основных способа переработки малоценного растительного сырья: физический, химический и биологический. Последний способ открывает для человечества неограниченные возможности<sup>2</sup>.

Исследования по биоферментации соломы в энергетические и белковые корма активно проводятся в высокоразвитых странах: США, Канаде, Великобритании, Швеции, Финляндии, новых индустриальных странах: Бразилии, Индии, Китае и странах с переходной экономикой: Украине, России и других странах мира<sup>3</sup>. Однако, до настоящего времени, в литературе практически отсутствуют сведения о широкомасштабном производстве обогащенных белком кормов из соломы, что связано, по-видимому, с необходимостью проведения длительных токсикологических и зоотехнических испытаний получаемых конечных продуктов.

В начале прошлого столетия начинают проводиться первые исследования, направленные на улучшение питательных свойств соломы.

Начиная с 1894 г русский ученый В.Д. Омелянский изучал процесс брожения целлюлозы над шведской фильтровальной бумагой, которая была помещена в питательный раствор из солей и обнаружил загадочные нитевидные формы: в поле зрения микроскопа ученого попали микроорганизмы, разлагавшие клетчатку. Это были микрогрибы. В связи с этим Омелянский придал огромное значение этому колоссальному естественному процессу<sup>4</sup>.

Исследователи П.В. Котовский, Е.И. Боровкова в 1939 году предложили способ обработки соломы гидроокисью железа<sup>5</sup>.

---

<sup>1</sup> Леснов, А.П. Солома как энергетический и белковый источник для животноводства / А.П. Леснов // Машинно-технологическая станция. – 2008. - № 6. – С. 51 – 54.

<sup>2</sup> Беловежец, Л.А. Перспективные способы переработки вторичного лигноцеллюлозного сырья / Л.А. Беловежец, И.В. Волчатова, С.А. Медведева // Химия растительного сырья. – 2010. - № 2. – С. 5 – 16.

<sup>3</sup> Lijuan, G. Rice straw fermentation using lactic acid bacteria / G. Lijuan, Y. Hongyan, W. Xiaofen [and others] // Bioresource Technology. – 2008. - № 99 (8). – p. 2742 – 2748.

<sup>4</sup> Исаченко, Б. Целлюлозное брожение / Б. Исаченко // Энциклопедический словарь / Ф.А. Брокгауз, И.А. Ефрон. – СПб., 1890 – 1907. – Т. 1 – 86.

<sup>5</sup> Котовский, Л.В. Повышение переваримости соломы путем обогащения ее минерального состава водой / Л.В. Котовский, Е.И. Боровкова // Вестник с.-х. науки. Кормодобывание. – 1940. - № 3.

В разработанном в 1950 году И.М. Захарченко щелочно-кислотном способе обработки соломы для обработки 1 ц растительных отходов использовалось 250 - 300 литров 1,5 – 2 %-го раствора соляной кислоты. После чего отжимали воду с вредными веществами, корм промывали и скармливали животным<sup>1</sup>.

В.А. Бондаренко в 1958 году предложил щелочной способ обработки малоценного кормового сырья. Он заключается в том, что солому (100 кг) сначала 6 часов выдерживают в растворе едкого натрия (400 л воды и 4 кг кристаллического порошка NaOH), а затем 3 часа – в растворе соляной кислоты (5 кг кислоты, разведенной в 300 л воды)<sup>2</sup>.

П.А. Кормщиков в 1968 году рекомендовал проводить известкование растительных отходов. Для этого солому сначала выдерживают в известковом молоке (90 кг известкового теста растворяют в 2000 - 2500 л воды) в течение 10 - 15 минут, а затем от 18 ч. до 3-х суток в воде. После чего скармливают животным<sup>3</sup>.

Ряд ученых – И.Н. Ткачев (1962 г.), А.П. Докунин (1967 г.), С.Я. Зафрен (1972 г.) – приводят идентичные способы обработки соломы едким натрием (каустической содой). Сущность метода заключается в том, что растительное сырье, измельченное послойно, поливают раствором едкого натрия и выдерживают 8 - 10 ч, после чего скармливают животным.

И только в 1969 году американские ученые Е. Риз, Р. Сегу и Х. Левинстон, опубликовали первые фундаментальные работы по гидролизу клетчатки с помощью микрогрибов.

С.Я. Зафреном в 1977 году был предложен щелочной способ. В цистерну V 5 - 7 м<sup>3</sup> наливают воду из расчета 400 - 800 л на 100 кг малоценного сырья. Паром нагревают воду до 60 – 65 °С. Загружают 30 – 35 % соломы от массы смеси, остальные 65 – 70 % массы должны составлять измельченные

---

<sup>1</sup> Захарченко, И.М. Щелочно-кислый способ повышения питательности соломы / И.М. Захарченко // Советская зоотехния. – 1950. - № 2.

<sup>2</sup> Леснов, А.П. Солома как энергетический и белковый источник для животноводства / А.П. Леснов // Машинно-технологическая станция. – 2008. - № 6. – С. 51 – 54.

<sup>3</sup> Кормщиков, П.А. Теория и практика преобразования соломы в ценный корм / П.А. Кормщиков. – Челябинск : Южно-Ур.кн.изд., 1968. – 252 с.

крахмалистые или сахаристые корма: зерно, жом свекловичный, меласса. К смеси добавляют раствор из суперфосфата и сульфата аммония. Кроме того, в цистерну вносят 10 – 15 кг солода и 0,2 - 0,3 л соляной кислоты на 1 т обрабатываемой массы. Массу пропаривают до 80 – 90 °С в течение 1,5 - 2 часов. Далее массу охлаждают до 28 – 30 °С, после чего к ней добавляют закваску дрожжей в количестве 5 – 8 %. Далее все ингредиенты перемешивают и оставляют для выдерживания дрожжей. Для интенсивного размножения дрожжей, сквозь кормовую массу, через каждые 2 - 3 часа пропускают воздух. Через 9 - 12 часов корм готов<sup>1,2</sup>.

Из способов получения грибного белка на основе ферментации соломы наиболее известным, доведенным до стадии промышленной реализации, является процесс «Ватерлоо», разработанный в университете Ватерлоо в Канаде<sup>3</sup>. Этот процесс основан на выращивании целлюлозоразрушающих грибов, его можно осуществлять как в глубинной культуре, так и поверхностным способом. При использовании твердого субстрата такие материалы, как кукурузная солома или шлам из отстойников фабрик по производству крафтовой бумаги, сначала подвергаются термической и химической обработке, затем следует аэробное выращивание грибов, отделение и высушивание мицелия. Содержание белка в конечном продукте может составлять 45%.

В 1979 году работниками ТСХА была разработана технология получения углеводно-белкового корма ферментно-дрожжевым способом из растительных остатков. Суть технологии заключается в неполном разрушении клетчатки, гемицеллюлозы и других полисахаридов в сырье, при этом ученые добились значительного повышения питательности таких малоценных кормов. Более ясно эту схему можно представить следующим образом: с помощью специальных ферментных препаратов целловиридина и пектофостидина

---

<sup>1</sup> Зафрен, С.Я. Обработка соломы аммиаком / С.Я. Зафрен // Химия в сельском хозяйстве. – 1979. - № 2. – С. 38.

<sup>2</sup> Зафрен, С.Я. Как повысить питательную ценность соломы / С.Я. Зафрен. – М. : Колос, 1972. – 89 с.

<sup>3</sup> Murray, M.Y. Bioconversion of cereal grain straws to protein-enriched product / M.Y. Murray // Biotechnology Advances. – 1983. - № 2. – 371 p.

частично разрушаются в сырье полисахариды, а на получаемых редуцирующих сахарах выращиваются обычные пекарские дрожжи. Таким путем получается углеводно-белковый корм на основе малоценного растительного сырья, имеющий приятный запах и главное – высокую питательность. В поисках более независимого и дешевого пути получения углеводно-белкового корма из соломы в ТСХА пошли по другому пути – отказались от ферментных препаратов и заменили их специально разработанными заквасками. Солому обрабатывают биологическим, то есть естественным способом с помощью специальных микроорганизмов в виде закваски, 5 граммов которой достаточно для обработки 1 тонны соломы. При этом питательность соломы повышается более чем в 2 раза. Так что 2 килограмма соломы по питательной ценности можно сравнить с килограммом зерна<sup>1</sup>.

#### **1.4.1. Применение соломы в животноводстве**

В соломе почти полностью отсутствуют витамины, важные для животных минеральные вещества, содержится много кремнекислоты и клетчатки, переваримость злаковой соломы в 2 раза ниже, чем зерна. Из-за большого объема, жесткости, высокого содержания клетчатки и низкого содержания питательных веществ животные не способны потреблять солому в больших количествах<sup>2</sup>. Рационы, насыщенные соломой, не обеспечивают высокую продуктивность животных. Солома бобовых культур, гречихи, рапса значительно богаче по питательности соломы зерновых культур, из которых яровая более ценна как корм в сравнении с озимой соломой<sup>3</sup>.

Издавна для обеспечения чистоты в животноводческих помещениях и накопления качественных органических удобрений, использовали солому в

---

<sup>1</sup> Леснов, А.П. Солома как энергетический и белковый источник для животноводства / А.П. Леснов // Машинно-технологическая станция. – 2008. - № 6. – С. 51 – 54.

<sup>2</sup> Применение соломы зерновых культур на удобрение в Томской области // Рекомендации / ГНУ СибНИИТ СО РАСХН. Департамент социально-экономического развития села Томской области. – Томск, 2004. – 10 с.

<sup>3</sup> Авраменко, П.С. Содержание обменной энергии в химически консервированном силосе / П.С. Авраменко, Л.М. Постовалова, Г.В. Шамрицкая // Научные основы развития животноводства в БССР : Межведомственный сборник / Белорусский научно-исследовательский институт животноводства. – Минск, 1988. – Т. 18. – С. 78 – 83.

качестве подстилки. Она отвечает большинству требований, предъявляемых к подстилке: мягкая, сухая, влагоемкая, немаркая, без запаха и плесени, а также способность поглощать газы, убивать микробы и иметь удобрительную ценность. Один килограмм соломы зерновых культур способен поглотить 3 кг жидких экскрементов, причем резаная солома больше пригодна для этого, чем целая. В районах с развитой переработкой леса эффективно использование в качестве подстилки сухих опилок, которые близки по влагоемкости к соломе<sup>1</sup>.

#### **1.4.2. Солома в качестве органического удобрения**

Солома больше, чем другие органические удобрения, содержит органического вещества, причем очень ценного для повышения плодородия почвы: целлюлоза, пентозаны, гемицеллюлоза и лигнин, которые являются углеродистыми энергетическими субстратами для почвенных микроорганизмов. Это основной строительный материал для гумуса почвы. По содержанию органического вещества 1 т соломы эквивалентна 3,5 - 4,0 т навоза<sup>2</sup>.

В состав соломы входят все необходимые растениям питательные вещества, которые после минерализации становятся более доступны. Микроэлементов в соломе больше, чем в зерне<sup>3</sup>.

Пшеничная солома имеет следующий химический состав в % от сухого вещества: азот – 1,33; фосфор – 0,04; калий– 0,78; лигнин – 52,21; клетчатка – 47,05 %.

Из анализа соломы следует, что при урожае соломы в 5 т/га в почву ежегодно возвращается до 40 кг/га  $K_2O$  и до 66 кг/га азота, как наиболее существенные составляющие соломы из минерального питания. Кроме того, в соломе содержатся многие микроэлементы. Конечно, питательные элементы, связанные в органическом веществе, будут доступны для растений только через

---

<sup>1</sup> Ездаков, Н.В. Применение ферментных препаратов в кормопроизводстве / Н.В. Ездаков, В.В. Шерстобитов, А.П. Левицкий [и др.] // Перспективы применения ферментных промышленных препаратов в отрасли кормопроизводства. – Киев : Упр. по печати, 1991. – С. 41 – 48.

<sup>2</sup> Попов, П.Д. Расчёт баланса соломы в хозяйстве / П.Д. Попов, М.Н. Новиков // Методические рекомендации ВНИПТИОУ. – Владимир, 1987. – 10 с.

<sup>3</sup> Применение соломы зерновых культур на удобрение в Томской области // Рекомендации / ГНУ СибНИИТ СО РАСХН. Департамент социально-экономического развития села Томской области. – Томск, 2004. – 10 с.

3 - 5 лет – после разложения соломы. Но при систематическом внесении соломы эта проблема отпадет сама собой. Ежегодное внесение соломы на 3 - 4 год повышает количество наиболее ценных водопрочных агрегатов размером более 0,25 мм и увеличивает водопроницаемость почвы<sup>1</sup>.

### **1.5. Состояние с производством кормов в Орловской области и перспектива развития направления**

В Орловской области площадь естественных кормовых угодий составляет 370 тыс. га, т.е. в 4 раза меньше пахотных земель. Они расположены в основном на овражно-балочных землях.

Так как продуктивность природных сенокосов и пастбищ очень низка, то за счет полевого кормопроизводства в нашей стране, в том числе и в области, заготавливается 70 – 80 % всех кормов. В структуре посевных площадей кормовых культур в России ведущее место занимают многолетние (64 %) и однолетние (22 %) травы, а также кукуруза на силос и зеленый корм (9 %). На долю остальных кормовых культур приходится около 5 %. В Орловской области под многолетними травами в 2005 г. было занято 56 %, под однолетними – 28 %, под кукурузой на силос и зеленый корм – 10 %, остальные кормовые культуры занимали 6 %. Основная проблема современного кормопроизводства - низкое содержание перевариваемого протеина. По зоотехническим нормам на 1 к. ед. должно приходиться 110 г., а фактически получается 75 – 80 г. Это ведет к перерасходу кормов на единицу животноводческой продукции примерно в 1,5 раза, а также к её резкому удорожанию и снижению качества<sup>2</sup>.

Пшеница и рожь мало используются в качестве зернофуража. В конце XX - начале XXI веков посевная площадь пшеницы (озимой и яровой) в мире составляла около 230 млн. га. (32 % от общей площади зерновых культур),

---

<sup>1</sup> De-shui, T. Effect of Long-Term Application of K Fertilizer and Wheat Straw to Soil on Crop Yield and Soil K Under Different Planting Systems / T. De-shui, J. Ji-yun, H. Shao-wen [and others] // Agricultural Sciences in China. – 2007. - № 2 (6). – p. 200 – 207.

<sup>2</sup> Коломейченко, В.В. Современные резервы увеличения производства кормов / В.В. Коломейченко // Вестник ОрелГАУ. – 2007. - № 1(4). – С. 32 – 38.

валовой сбор - 600 млн. т (29 % от общего производства зерна) и средняя урожайность - 2,6 т/га. В Орловской области посевная площадь озимой пшеницы составляет 272 тыс. га и яровой 68 тыс. га (38,0 % и 9,5 % от общей площади зерновых культур), валовой сбор - 745 и 145 тыс. т (44,8 % и 8,7 % от общего сбора зерна), урожайность 2,8 и 2,2 т/га, т.е. на 0,4 т/га выше и на 0,2 т/га ниже, чем средняя для зерновых культур.

В Орловской области в 2011 году количество соломы составило 1,2 млн. т. Из этого объема в лучшем случае 5-10% расходуется на хозяйственные потребности: удобрения, корм, подстилку для скота и т.д.

Для того, чтобы восстановить животноводство, потребуется большая работа по повышению качества кормов, которые заготавливаются на стойловый период (сено, силос, сенаж). За последние 15 лет никакой серьезной работы в этом направлении в нашей стране, в том числе и в Орловской области, не проводилось. А заготовка витаминных кормов высокотемпературной сушки (мука, гранулы, резка, брикеты) полностью прекращена, так как все агрегаты давно разгромлены. Если не удастся быстро наладить их производство, то Россия, в том числе и Орловская область, будет привязана к зарубежным комбикормам<sup>1</sup>.

На основании вышесказанного разработка технологии биоконверсии целлюлозосодержащих отходов в ценные кормовые продукты представляется насущной и актуальной проблемой как в Орловской области, так и во многих аграрных регионах страны.

---

<sup>1</sup> Коломейченко, В.В. Современные резервы увеличения производства кормов / В.В. Коломейченко // Вестник ОрелГАУ. – 2007. - № 1(4). – С. 32 – 38.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные исследования выполнены в период с 2010 по 2013 гг. в соответствии с Федеральной целевой программой «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 - 2012 годы» (разработана в соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации от 6 июля 2006 г. № 977-р) и отвечает пункту 8 «Нано-, био-, информационные, когнитивные технологии» «Перечня критических технологий Российской Федерации» (утв. Указом Президента РФ от 7 июля 2011 г. N 899). Исследования проводились на базе ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» Орловского государственного аграрного университета, лаборатории биотехнологии ОрелГАУ.

Структурная схема исследований приведена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Структурная схема исследований

В качестве объекта исследования были выбраны растительные целлюлозосодержащие отходы сельскохозяйственного производства, в частности солома яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) и гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum*), пшеничные отруби, некондиционное зерно.

Экспериментальное сырье высушивалось при температуре 80 °С до остаточной влажности 6 – 8 % и измельчалось до размера частиц 1 - 2 мм на лабораторной зерновой мельнице ЛЗМ. Влажность сырья контролировали анализатором влажности Sartorius MA 150.

Для биоконверсии целлюлозосодержащего сырья и получения кормового белка в работе использовали грибы рода *Trichoderma harzianum* ВКМ F-4099D, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, предоставленные ГНУ ВНИИ ЗБК г. Орёл, биопрепарат Байкал ЭМ-1 (ТУ 9291-001-507105-75-00).

### ***Trichoderma harzianum***

Микромицет *T. harzianum* способен продуцировать целлюлолитические ферменты (эндо-β-1,4-глюканазы (ЕС 3.2.1.4), экзо-целлобиогидролазы (ЕС 3.2.1.91), и β-глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21)), которые эффективно секретируются в культуральную среду и синергически осуществляют гидролиз высокомолекулярных труднорасщепляемых растительные полисахаридов. Грибы технологичны, нетребовательны к субстрату, устойчивы к экологическому стрессу.

При разработке режимов твердофазной биоферментации целлюлозосодержащего сырья в качестве питательного субстрата использовалась предварительно подготовленная солома яровой пшеницы и гречихи. Посевным материалом служила культуральная жидкость гриба *T. Harzianum* ВКМ F-4099D, полученная при его культивировании на природной питательной среде (пшеничные отруби), целлюлолитическая активность которой составляла 24,0 ед/мл. Для ферментативной обработки КЖ стандартизовали, предварительно разбавляя ее таким образом, чтобы на 1 грамм субстрата приходилось 10 единиц целлюлолитической активности. Клетки гриба от КЖ не отделяли. Режим ферментативного гидролиза

следующий: суспензия субстрата (после термогидролиза) с содержанием влаги 10 %, перемешивание 120 - 150 об/мин., рН 5,0 - 5,4, температура 50 °С. Культивирование проводили на стерильном субстрате в лабораторном реакторе Biostat A plus (рабочий объем 3 л) в стерильных условиях, 10 % по влажности субстрата при высоте слоя 60 мм, рН 4,5 и аэрации.

Материалом микробиологической переработки служил вторичный отход сельскохозяйственного производства - солома пшеницы, высушенная до влажности 6 – 8 % и измельченная до размера частиц 1,5 - 2,0 мм.

Посевной материал *T. harzianum* выращивали на агаризованной среде Чапека при температуре 28 °С, 5 суток в термостате. Выделение и исследование характеристик культур микроорганизмов проводили с использованием стандартных методов<sup>1</sup>.

Культуральная жидкость (КЖ) грибов рода *T. harzianum* была получена при его культивировании на природной питательной среде (пшеничные отруби), целлюлолитическая активность которой составляла 24,0 ед/мл.

В качестве посевного материала для твердофазной ферментации, спорово-мицелиальную суспензию микромицета фильтровали и разбавляли из расчета  $1 \times 10^6$  спор на 1 грамм субстрата.

Поскольку при культивировании грибов на целлюлозосодержащих субстратах целлюлолитические ферменты секретируются непосредственно в культуральную жидкость, нами была исследована возможность использования КЖ грибов рода *T. harzianum* в качестве препарата для ферментативного гидролиза соломы зерновых культур.

Для ферментативной обработки культуральную жидкость стандартизовали, предварительно разбавляя ее таким образом, чтобы на 1 грамм субстрата приходилось 10 единиц целлюлолитической активности. Клетки гриба от КЖ не отделяли. Режим ферментативного гидролиза следующий: 10% суспензия субстрата (после термогидролиза), перемешивание

---

<sup>1</sup> Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. 2-е изд., перераб. и доп. / Н.Б. Градова, Е.С. Бабусенко, И.Б. Горнова. – М. : ДеЛи принт, 2004. – 144 с.

150 об/мин., рН 5,0 - 5,4, температура 50 °С. Эффективность деструкции оценивали по накоплению редуцирующих веществ в ферментализате.

### **Байкал ЭМ-1 (ТУ 9291-001-507105-75-00)**

В состав препарата Байкал ЭМ-1 входят следующие микроорганизмы: фотосинтезирующие бактерии, молочнокислые бактерии, дрожжи, актиномицеты, ферментирующие грибы (*Aspergillus* и *Penicillium*)<sup>1</sup>. Штаммы способны синтезировать целлюлолитические ферменты и одноклеточный белок. Микроорганизмы биопрепарата не являются спорообразующими, согласно СанПин 23.2.1078-01 они входят в перечень веществ, не оказывающих вредного воздействия на кормовые продукты.

Приготовление маточной закваски биопрепарата Байкал ЭМ-1 проводили при рН 5,4 - 5,5 с внесением 0,5 % раствора лактозы для активации ферментирующих грибов и ингибирования молочнокислых бактерий, способных разрушить лактозу. К субстрату, состоящему из 1 части размола (0,3 части проросших зерен ячменя и 0,7 части пшеничных отрубей) и 1 части воды (80 – 100 °С) добавляли микробиологический препарат «Байкал ЭМ-1» из расчета 0,08 г на 1 кг субстрата и 0,5 % раствор лактозы из расчета 100 г на 1 кг субстрата. Полученную закваску оставляли для созревания на 5 - 6 часов, после чего использовали при засеве целлюлозосодержащего сырья. Для этого, в камеру объемом 3000 мл поместили измельченную солому пшеницы, прошедшую термогидролиз при рН 3,0, температура 112 °С, давление 0,5 атм, время экспозиции 25 минут, увлажнили ее до содержания влаги 65 % и добавили посевной материал. Ферментацию проводили в течение 3 суток (72 часа) в анаэробных условиях при температуре 24 – 26 °С с начальным рН 5,4 - 5,5. Спустя 36 часов в конце экспоненциальной фазы роста микроорганизмов для активации биосинтеза целлюлолитических ферментов в субстрат вносили 0,5 % раствор лактозы дискретно (из расчета 100 г на 1 кг сырья). Микробиологическую обработку соломы гречихи посевной проводили

---

<sup>1</sup> Байкал-ЭМ. Биоудобрение для Вашего сада и огорода : сайт фирмы-распространителя [Электронный ресурс] / АРГО. – Электрон. текстовые и граф. дан. – Новосибирск, 2012. – Режим доступа : <http://baykal-em.ru>. – Заглавие с экрана.

аналогично варианта с соломой пшеницы. Субстрат подвергали термогидролизу при рН 3,0, температуре 112 °С, время экспозиции 25 минут. Затем рН ферментационного субстрата доводили до рН 5,4 - 5,5.

### *Fusarium oxysporum*

При разработке режимов глубинной гетерофазной ферментации в качестве питательного субстрата служила среда Чапека без агара, пшеничные отруби и свекловичная меласса. В качестве посевного материала использовался гриб *F. Oxysporum f. sp. pisi*, предварительно выращенный в термостате на агаризованной среде. Культивирование гриба проводили в лабораторном реакторе infors Minifors в стерильных условиях, влажность субстрата 80 %, объем среды 2 л, аэрация, перемешивание 150 об/мин, 5 суток.

Глубинную ферментацию целлюлозосодержащих отходов (солома пшеницы и пшеничные отруби) грибами вида *F. oxysporum* выполняли в лабораторном биореакторе Infors Minifors при температуре 26 °С и режиме перемешивания 150 оборотов в минуту, на протяжении семи суток в аэробных условиях с корректировкой рН.

Накопление микробной биомассы в культуральной жидкости определяли методом посева на плотные питательные среды (чашечный метод Коха)<sup>1</sup>, а также прямым подсчетом клеток в камере Горяева<sup>2</sup>. Анализ микробиологической чистоты культур определяли с помощью светового микроскопа Olympus CX 21.

При исследовании состава целлюлозосодержащего сырья и полученных продуктов использовали как общепринятые, регламентируемые ГОСТами, так и специальные методы и приборы, используемые при биотехнологическом контроле.

---

<sup>1</sup> Селивановская, С.Ю. Тестирование отходов, почв, материалов с использованием живых систем : учебно-методическое пособие / С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая, Р.Х. Гумерова. – Казань : Казанский университет, 2011. – 47 с.

<sup>2</sup> Камеры для счета форменных элементов крови и клеточных элементов спинно-мозговой жидкости : техническое описание и инструкция по эксплуатации / Ленинградское орд. Ленина и орд. Октябрьской Революции произв. объединение «Красногвардеец» // Laboratorium.dp.ua [Электронный ресурс] : документация на лабораторное оборудование / Днепропетровская гос. мед. академия, каф. гистологии. – Электрон. текстовые и граф. дан. – Днепропетровск, 2009. – Режим доступа : <http://www.laboratorium.dp.ua>. – Заглавие с экрана.

## **Определение количества клеток высевам на плотные питательные среды (чашечный метод Коха).**

Сущность метода заключается в высеве определенного объема исследуемой суспензии микроорганизмов на плотную среду в чашки Петри и подсчете выросших после инкубации колоний. Принято считать, что каждая колония — потомство одной клетки.

### *Методика определения*

Численность популяции микроорганизмов обычно достаточно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений. Разведения готовят в водопроводной воде или 0,34%-ном растворе NaCl, используя постоянный коэффициент разведения, чаще всего равный 10. В ходе опыта целесообразно использовать один и тот же коэффициент разведения, так как это уменьшает вероятность ошибки. Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разливают по 9 мл в стерильные сухие пробирки. Затем 1 мл исследуемой суспензии стерильной пипеткой переносят в пробирку с 9 мл стерильной воды — это 1-е разведение,  $10^{-1}$ . Полученное разведение тщательно перемешивают новой стерильной пипеткой, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь.

Эту процедуру выполняют 3 — 5 раз, затем этой же пипеткой отбирают 1 мл полученной суспензии и переносят во 2-ю пробирку — получают 2-е разведение,  $10^{-2}$ . Таким же образом готовят и последующие разведения. Степень разведения зависит от плотности исследуемой популяции микроорганизмов; соответственно она тем больше, чем больше плотность популяции. Для приготовления каждого разведения следует обязательно использовать новую пипетку. Пренебрежение этим правилом приводит к получению ошибочного результата.

Высевать суспензию можно поверхностным или глубинным способом. Перед посевом поверхностным способом разливают расплавленную, чаще всего агаризованную, питательную среду в ряд стерильных чашек Петри по 15 — 20 мл в каждую. Чашки оставляют на горизонтальной поверхности, пока среда не

застынет. Поверхность агаризованных сред перед посевом рекомендуется подсушивать для удаления конденсационной воды. С этой целью чашки Петри открывают и застывшей средой вниз помещают на 20 — 30 мин в термостат. После того как среда готова, на ее поверхность стерильной пипеткой наносят точно измеренный объем (0,05 или 0,1 мл) соответствующего разведения и распределяют его стерильным стеклянным шпателем по поверхности среды.

Высевы на плотную среду проводят, как правило, из трех последних разведений, причем из каждого делают 2 — 4 параллельных высева. Посевы можно делать одной пипеткой, но при этом начинать следует обязательно с большего разведения. Для каждого разведения используют новый стерильный шпатель. После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз.

Подсчет выросших колоний. Колонии бактерий подсчитывают обычно через 3 суток инкубации в термостате. Подсчет, как правило, проводят, не открывая чашек Петри. Для удобства чернилами или карандашом по стеклу отмечают просчитанную колонию точкой на наружной стороне дна чашки. При большом количестве колоний дно чашки Петри делят на секторы, подсчитывают число колоний в каждом секторе и результаты суммируют. Лучшим разведением следует считать то, при высеве из которого на агаровой пластинке в чашке Петри вырастает от 30 — 50 до 100 — 150 колоний. Если число выросших колоний оказалось меньше 10, то эти результаты для расчета количества клеток в исходном материале не используют.

Результаты параллельных высевок из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеве из данного разведения на одной чашке.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10n}{V},$$

где  $M$  — количество клеток в 1 мл;

$a$  — среднее число колоний при высеве данного разведения;

10 — коэффициент разведения;

$n$  — порядковый номер разведения, из которого сделан высев;

$V$  — объем суспензии, взятый для посева, в мл.

Содержание сырого протеина в сырье и полученных кормовых продуктах определяли титриметрическим методом по Кьельдалю и колориметрическим методом по Лоури.

### **Титриметрический метод определения азота по Кьельдалю (основной метод)<sup>1</sup>.**

Принцип метода состоит в разложении пробы кормового средства кипящей концентрированной серной кислотой с образованием солей аммония, перевода аммония в аммиак, отгонке его в раствор серной кислоты, количественном определении избытка серной кислоты путем титрации раствором натрия гидроксида и расчета содержания азота в исследуемом материале.

Среднюю пробу сена, силоса, сенажа, зеленых кормов и других кормовых средств измельчают на отрезки длиной до 1—3 см; корнеплоды и клубнеплоды разрезают на пластинки (ломтики) толщиной до 0,8 см. Методом квартования выделяют среднюю часть пробы массой 100—150 г и высушивают в сушильном шкафу до воздушно-сухого состояния. Затем пробу размалывают на лабораторной мельнице и просеивают через сито. Среднюю пробу комбикормов и сырья размалывают и просеивают без предварительного просушивания через сито.

Подготавливают необходимые растворы и реактивы.

Катализатор 1: смешивают 10 весовых частей сернистой меди, 100 весовых частей сернистого калия, 2 весовые части селена, тщательно измельчают в ступке до мелкозернистого порошка.

Катализатор 2: смешивают 10 весовых частей сернистой меди и 100 весовых частей сернистого калия, тщательно растирают в ступке до получения мелкозернистого порошка.

---

<sup>1</sup> ГОСТ 13496.4-93. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина. – Взамен ГОСТ 13496.4 – 84 ; введ. 01.01.95. – М. : Стандартинформ, 2011. – 18 с. : ил.

Для приготовления раствора серной кислоты, содержащей селен, аморфный или растертый селен из расчета 5 г на 1 л кислоты, растворяют при нагревании в концентрированной серной кислоте в термостойкой колбе в течение 3 часов до обесцвечивания.

Для приготовления 0,05 моль/л 0,1 н. раствора серной кислоты используют стандарт-титр серной кислоты. Раствор готовят в соответствии с правилами, приложенными к комплекту. Допускается приготовление 0,05 моль/л раствора серной кислоты из концентрированной серной кислоты.

Приготовление 4 %-ного раствора борной кислоты: 40 г борной кислоты растворяют в небольшом количестве теплой воды при нагревании и переносят в колбу вместимостью 1000 мл, после охлаждения доводят объем водой до 1000 мл.

При титровании применяют один из следующих индикаторов: индикатор 1—растворяют 0,20 г метиленового красного и 0,10 г метиленового голубого в 100 мл 96 %-ного этанола; индикатор 2 — смешивают 3 объема 0,1 %-ного раствора бромкрезолового зеленого в этиловом спирте и 1 объем 0,2 %-ного раствора метилового красного в этиловом спирте. Хранят индикаторы в темной склянке.

В колбу Кьельдаля помещают 0,7—1 г измельченного растительного материала, 0,3—0,5 г муки животного происхождения, 0,4—0,5 г кормов микробного происхождения, 0,5 г комбикормов и проводят минерализацию одним из двух способов.

Способ 1: в колбу Кьельдаля добавляют 2 г смешанного катализатора 1 или 8 г катализатора 2, затем осторожно наливают концентрированную серную кислоту в количествах соответственно 10 или 15 мл.

Способ 2: в колбу Кьельдаля вносят 10 мл 30 %-ного раствора перекиси водорода в качестве окислителя. После прекращения реакции вливают такое же количество концентрированной серной кислоты. Для ускорения сжигания наиболее целесообразно использовать серную кислоту с селеном.

Содержимое колбы перемешивают. Колбу ставят на электрическую плитку. В горло колбы вставляют стеклянную воронку или втулку с целью уменьшения улетучивания паров серной кислоты. Нагревание колбы проводят постепенно, периодически встряхивая содержимое круговыми движениями. После исчезновения пены нагревание усиливают до кипения. После того как жидкость обесцветится (допускается слегка зеленоватый оттенок), нагрев колбы продолжают еще в течение 30 мин. После охлаждения минерализат количественно переносят в отгонную колбу. Колбу Кьельдаля 3 раза ополаскивают 20 — 30 мл дистиллированной воды. Общий объем раствора в отгонной колбе должен составлять 200— 250 мл.

Отгонку минерализата можно проводить непосредственно из колбы Кьельдаля. В этом случае используют колбу емкостью 500 мл. Перед отгонкой аммиака минерализат разбавляют 150— 200 мл дистиллированной воды.

Колбу Кьельдаля или отгонную колбу через холодильник соединяют с приемной колбой, в которую предварительно заливают 20 мл 4 %-ного раствора борной кислоты и 5 капель любого из смешанных индикаторов. Колбу подставляют под холодильник таким образом, чтобы его кончик был погружен в раствор борной кислоты на глубину не менее 1 см.

Отгонную колбу или колбу Кьельдаля подсоединяют к другому концу холодильника, вставляют через пробку, закрывающую горло колбы, капельную воронку, через которую осторожно приливают 60 мл 33—40 %-ного раствора гидроксида натрия. Воронку промывают 2—3 раза 10—15 мл дистиллированной воды, оставляя небольшое количество воды в качестве гидрозатвора. Колбу нагревают на электрической плитке или другом нагревательном приборе таким образом, чтобы обеспечить равномерное кипение.

В начале отгонки аммиака цвет раствора в приемной колбе меняется на зеленый. При оптимальном кипении объем раствора в приемной колбе через 20—30 мин обычно составляет 150— 200 мл. Окончание отгонки можно контролировать с помощью красной лакмусовой бумажки. Для этого приемную

колбу отставляют от аппарата, предварительно обмыв конец холодильника дистиллированной водой, и помещают лакмусовую бумажку под стекающие капли дистиллята. Если лакмус не синееет, отгон аммиака закончен, если синееет — отгонку продолжают. После окончания отгонки приемную колбу опускают и конец холодильника обмывают дистиллированной водой в приемную колбу. Оттитровывают аммиак из бюретки емкостью 25—50 мл 0,1 н. раствором серной кислоты до перехода окраски индикатора от зеленой в фиолетовую при использовании индикатора 1 и от зеленой в розовую при использовании индикатора 2.

Отгонку аммиака также можно производить в серную кислоту. Для этого в приемную колбу наливают 50 мл 0,1 н. раствора серной кислоты и проводят отгонку способом, описанным выше. После окончания отгонки содержимое приемной колбы (избыток 0,1 н. раствора серной кислоты) титруют раствором гидроокиси натрия (0,1 моль/л) до перехода окраски в зеленую.

Одновременно с проведением испытания делают контрольное исследование на загрязнение воды и реактивов аммиаком.

Объем серной кислоты, идущей на титрование в контрольном опыте в борную кислоту, не должен превышать 0,5 мл. При отгонке в серную кислоту объем раствора гидроокиси натрия, израсходованный на титрование, должен быть не меньше 49,5 см<sup>3</sup>.

#### *Обработка результатов*

Массовую долю азота (X) в испытуемой пробе в процентах от ее массы при проведении отгонки аммиака в борную кислоту вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times K \times 0,0014 \times 100}{M}, \text{ где}$$

$V_1$  — объем раствора серной кислоты, израсходованный на титрование испытуемого раствора, см<sup>3</sup>;

$V_0$  — объем раствора серной кислоты, израсходованный на титрование в контрольном опыте, см<sup>3</sup>;

$K$  — поправка к титру 0,05 ммоль/дм<sup>3</sup> раствора серной кислоты, если он приготовлен не из стандарт-титра;

0,0014 – количество азота, эквивалентное 1 см<sup>3</sup> раствора серной кислоты, г;

$M$  – масса навески, г;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

Массовую долю азота ( $X$ ) в испытуемой пробе в процентах от ее массы при отгонке аммиака в серную кислоту вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V_0 - V_1) \times K \times 0,0014 \times 100}{M}, \text{ где}$$

$V_0$  – объем 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора гидроокиси натрия, израсходованный на титрование 0,05 моль/дм<sup>3</sup> серной кислоты в контрольном опыте, см<sup>3</sup>

$V_1$  – объем 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора гидроокиси натрия, израсходованный на титрование серной кислоты в испытуемом растворе, см<sup>3</sup>;

$K$  – поправка к титру 0,1 моль/дм<sup>3</sup> раствора гидроокиси натрия;

0,0014 – количество азота, эквивалентное 1 см<sup>3</sup> 0,05 моль/дм<sup>3</sup> раствора серной кислоты;

$M$  – масса навески, г;

100 – коэффициент пересчета в проценты.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных испытаний. Результаты вычисляют до третьего десятичного знака и округляют до второго десятичного знака.

### **Колориметрический метод определения белка по Лоури<sup>1</sup>.**

Метод основан на реакции белков с реактивом Фолина, дающей синее окрашивание. Метод применяют для определения белка в растворах с концентрацией от 10 до 100 мкг.

Реактивы: 1) 2%-й раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 0,1 н. NaOH; 2) раствор 0,5%-го раствор 0,5 % CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O в 1 %-м растворе двухзамещенного виннокислого натрия или калия; 3) опытный раствор: готовят смешивая 1-й и 2-й растворы (50 : 1 по объёму), реактив годен в течение дня; 4) реактив Фолина.

---

<sup>1</sup> Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, М.И. Смирнова-Иконникова [и др.] ; под ред. А.И. Ермакова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л. : Колос, 1972. – 455 с.

### *Приготовление реактива Фолина.*

Для стандартного раствора 100 г вольфрамата натрия ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) и 25 г молибдата натрия  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 700 см<sup>3</sup> воды. К смеси добавляют 50 см<sup>3</sup> 85 %-го раствора фосфорной и 100 см<sup>3</sup> соляной кислот ( $\rho = 1,19$ ). Затем кипятят (не слишком сильно) 10 часов с обратным холодильником в вытяжном шкафу. После этого в колбу добавляют 150 г сернокислого лития, 50 см<sup>3</sup> воды и 5 капель бромной воды. Смесь кипятят в течении 15 мин в вытяжном шкафу для удаления избытка брома, после охлаждения доводят водой до 1 дм<sup>3</sup>. Затем фильтруют и хранят в тёмной склянке с притёртой пробкой. Раствор должен быть ярко-жёлтого цвета. Обычно перед употреблением реактив Фолина разбавляют в 2 раза. Раствор можно хранить длительное время.

### *Ход работы.*

К 0,4 см<sup>3</sup> раствора белка добавляют 2 см<sup>3</sup> опытного раствора. Смесь перемешивают и через 10 мин приливают к ней 0,2 см<sup>3</sup> рабочего раствора Фолина. Интенсивность окраски определяют на ФЭК-56М с красным светофильтром (или на спектрофотометре при 750 нм) через 30 мин. Количество белка в растворе находят по калибровочной кривой.

Для построения калибровочной кривой 100 мг чистого белка (сывороточного  $\gamma$  – глобулина, кристаллического альбумина и др.) растворяют в 100 см<sup>3</sup> 0,1 н. NaOH (1 см<sup>3</sup> содержит 1 мг белка). В 9 мерных колб на 10 см<sup>3</sup> приливают раствор белка в возрастающих количествах: 0,5 см<sup>3</sup>, а затем от 1 до 8 см<sup>3</sup>. Раствор в колбах доводят водой до метки, перемешивают и из каждой колбы берут по 0,4 см<sup>3</sup> для определения белка по указанной прописи. По полученным данным вычерчивают калибровочную кривую.

Определение сырой клетчатки в сырье и полученных продуктах проводили с помощью системы Fibertec 1020 и по методу Геннеберга и Штомана.

## Метод определения содержания сырой клетчатки с использованием полуавтоматических систем<sup>1</sup>.

Навеску испытуемой пробы массой  $(1,000 \pm 0,001)$  г помещают в стеклянный фильтрующий тигель (пористость Р2), содержащий слой кварцевого песка толщиной 5 мм. Штатив со стеклянными фильтрующими тиглями вставляют в "горячий" экстрактор аппарата и подсоединяют к колонкам. С помощью насоса подачи реактивов добавляют в каждый тигель по 150 см горячего раствора серной кислоты. Для предотвращения пенообразования добавляют несколько капель октилового спирта и доводят до кипения. Автоматически (с помощью таймера) устанавливают время кипения - 30 мин с момента закипания. После кипячения в течение 30 мин открывают клапаны и фильтруют раствор кислоты через тигли под вакуумом. Остаток промывают три раза горячей дистиллированной водой объемом по 30 см , каждый раз отсасывая ее с помощью вакуума. Если возникают проблемы с фильтрованием, обратным током воздуха продувают фильтры тиглей.

Закрывают выпускные отверстия тиглей и приливают по 150 см горячего раствора гидроксида калия. Добавляют несколько капель октилового спирта и кипятят в течение 30 мин, фильтруют и промывают, как указано выше.

Штатив с тиглями переносят в "холодный" экстрактор аппарата и промывают три раза ацетоном объемом по 25 см , каждый раз отсасывая ацетон под вакуумом. Тигли с остатками переносят в сушильный шкаф и сушат 4 часа при температуре  $(105 \pm 2)$  °С или 3 часа при  $(130 \pm 2)$  °С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают, после чего озоляют в муфельной печи при  $(550 \pm 20)$  °С в течение 3 ч, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

### *Обработка результатов*

Массовую долю сырой клетчатки в сухом веществе испытуемой пробы  $y$ , %, вычисляют по формуле

$$y = \frac{(m_1 - m_2)}{m_3} 100 \frac{100}{100 - m_4},$$

---

<sup>1</sup> ГОСТ Р 52839-2007. Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации. – введ. 01.01.99. – М. : Стандартинформ, 2008. – 12 с.

где  $m_1$  - масса нутч-фильтра с клетчаткой после высушивания, г;  
 $m_2$  - масса нутч-фильтра после озоления, г;  
 $m_3$  - масса навески, г;  
 $m_4$  - массовая доля гигроскопической влаги, %;  
 $(100 - m_4)$  - массовая доля сухого вещества, %;  
100 - коэффициент пересчета в проценты.

За окончательный результат определения принимают среднеарифметическое значение двух параллельных определений массовой доли сырой клетчатки, полученных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости

$$y_1 - y_2 \leq r_{abc},$$

где  $y_1$  и  $y_2$  - результаты двух параллельных измерений, %;  
 $r_{abc}$ , % - значение предела повторяемости.

Если расхождение между результатами параллельных определений превышает предел повторяемости, необходимо устранить выявленные недостатки и повторить анализ данного образца в двух параллелях. За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение повторных параллельных определений, имеющих расхождение в допустимых пределах.

Если расхождение между параллельными определениями вновь превышает допустимый норматив контроля повторяемости, анализы приостанавливаются до выяснения и устранения причин неудовлетворительной повторяемости.

Результат анализа представляют в виде  $(\bar{y} \pm \Delta)\%$  при  $P = 0,95$ ,

где  $\bar{y}$  - среднеарифметическое значение двух параллельных измерений, признанных приемлемыми, %;

$\Delta$  - границы абсолютной погрешности измерения при  $P = 0,95$ , %.

## **Метод определения содержания сырой клетчатки по Геннебергу и Штоману<sup>1</sup>.**

Метод основан на последовательной обработке навески испытуемой пробы растворами кислоты и щелочи, озолении и количественном определении органического остатка весовым методом.

Содержание сырой клетчатки выражают в виде массовой доли в % или в граммах на 1 кг сухого вещества.

### *Подготовка проб*

Среднюю пробу сена, соломы, силоса, сенажа и зеленых кормов измельчают на измельчителе проб растений, ножницами или ножом на отрезки длиной от 1 до 3 см, корнеплоды и клубнеплоды нарезают ножом ломтиками толщиной до 0,8 см или измельчают на мезгообразователе. Измельченную пробу тщательно перемешивают.

Пробы сушат в сушильном шкафу при температуре  $(65 \pm 2)$  °С до воздушно-сухого состояния, позволяющего размалывать их на лабораторной мельнице, и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм. Остаток на сите после измельчения ножницами или растирания пестиком в фарфоровой ступке добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Средние пробы комбикормов, комбикормового сырья, зерна, жмыхов, шротов, искусственно высушенных кормов, брикетов и гранул размалывают и просеивают через сито. Средние пробы трудноразмалывающихся брикетированных и гранулированных кормов перед размалыванием на лабораторной мельнице измельчают пестиком в ступке.

### *Проведение испытания.*

#### *Кипячение с раствором серной кислоты.*

Навеску измельченной воздушно-сухой пробы массой  $(2,000 \pm 0,001)$  г помещают в стакан или коническую колбу вместимостью  $600 \text{ см}^3$ , приливают  $200 \text{ см}^3$  раствора серной кислоты и тщательно перемешивают стеклянной

---

<sup>1</sup> ГОСТ Р 52839-2007. Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации. – введ. 01.01.99. – М. : Стандартинформ, 2008. – 12 с.

палочкой. Для сохранения постоянного объема стакан накрывают круглодонной колбой, которую оснащают обратным холодильником. Если образуется пена, добавляют несколько капель пеногасителя (октилового спирта).

Содержимое стакана или колбы доводят до слабого кипения на электрической плитке и кипятят в течение  $(30 \pm 1)$  мин. Время устанавливают, пользуясь сигнальными часами.

#### *Первое фильтрование.*

Для предохранения вплавленной фильтрующей пластины нутч-фильтра от загрязнения сырой клетчаткой на стеклянный фильтр насыпают кварцевый песок на  $1/5$  высоты. При необходимости для фиксации кварцевого песка используют фарфоровый перфорированный диск.

Содержимое стакана по стеклянной палочке переносят в нутч-фильтр. Жидкость фильтруют с помощью электрического вакуумного или водоструйного насоса, или насоса Комовского. Промывание остатка и отсасывание жидкости проводят не менее пяти раз, добавляя каждый раз по  $10 \text{ см}^3$  горячей дистиллированной воды (температура  $95 \text{ }^\circ\text{C} - 100 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Отключают вакуум и в нутч-фильтр наливают ацетон в объеме, достаточном для покрытия остатка. Через некоторое время ацетон отсасывают.

Если в образце содержатся жиры, которые не могут быть предварительно полностью удалены петролейным эфиром, то после кипячения с кислотой дополнительно три раза промывают петролейным эфиром в объеме по  $30 \text{ см}^3$ .

#### *Кипячение с раствором гидроокиси калия.*

Содержимое нутч-фильтра переносят снова в тот же стакан или ту же коническую колбу, тщательно смывают прилипшие частички горячим раствором гидроокиси калия, после чего этим же раствором объем жидкости доводят до уровня  $200 \text{ см}^3$ . Затем содержимое стакана тщательно перемешивают и кипятят на электрической плитке в течение  $(30 \pm 1)$  мин. После окончания кипения в стакан добавляют не менее  $50 \text{ см}^3$  дистиллированной холодной воды, содержимое переносят в нутч-фильтр и фильтруют, как указано

выше. Остаток на фильтре последовательно промывают горячей дистиллированной водой от щелочи (при этом лакмусовая бумага обесцвечивается) и затем три раза ацетоном в объеме по 30 см<sup>3</sup>.

Нутч-фильтр с остатком сушат в течение 3 часов в сушильном шкафу при температуре (130±2) °С, охлаждают в эксикаторе, взвешивают и помещают на 3 часа в муфельную печь при (550±20) °С для озоления остатка. Охлажденный в эксикаторе нутч-фильтр снова взвешивают. Взвешивания проводят с точностью ±0,001 г.

*Анализ без пробы корма (холостой контроль).*

Одновременно с анализом испытуемой пробы проводят холостой контроль, используя те же реактивы и те же процедуры, за исключением взятия навески пробы. Отклонение массы нутч-фильтра в процессе озоления не должно превышать 2 мг.

*Обработка результатов.*

Аналогично метода определения содержания сырой клетчатки с использованием полуавтоматических систем.

**Содержание лигнина в сырье и полученных кормовых продуктах определяют по гостированной методике<sup>1</sup>.**

*Проведение испытания.*

Из абстрагированной пробы берут навеску массой около 1 г, взвешивают с погрешностью не более 0,0002 г, помещают в химический стакан и смачивают 15 мл кислотной смеси. Стакан с пробой помещают в водный термостат температурой 35,0 ± 0,5 °С и выдерживают 45 мин при периодическом перемешивании содержимого стакана.

По истечении указанного времени в стакан добавляют 400 мл дистиллированной воды, содержимое стакана нагревают до кипения и кипятят 15 мин.

---

<sup>1</sup> ГОСТ 11960-79. Полуфабрикаты волокнистые и сырье из однолетних растений для целлюлозно-бумажного производства. Метод определения содержания лигнина. – Взамен ГОСТ 11960 – 66 ; введ. 21.12.79. – М. : Издательство стандартов, 1980. – 9 с.

Стакан оставляют на 10 мин для охлаждения и отстаивания выделившегося осадка лигнина.

Раствор с осадком лигнина фильтруют через два уравновешенных бумажных фильтра или через фильтр со стеклянной пористой пластинкой.

При фильтровании через бумажный фильтр лигнин промывают раствором хлористого натрия до полного удаления следов кислоты, используя в качестве индикатора метиловый оранжевый.

Промывку лигнина на стеклянном фильтре проводят при слабом вакууме, который постепенно увеличивают.

Фильтры с осадком лигнина высушивают в сушильном шкафу при температуре  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  до постоянной массы, охлаждают в эксикаторе над хлористым кальцием до комнатной температуры, затем верхний фильтр с лигнином взвешивают с погрешностью не более 0,0002 г, при этом нижний фильтр перекадывают на чашку весов с разновесами.

При фильтровании через фильтр со стеклянной пористой пластинкой лигнин фильтруют в горячем состоянии через предварительно высушенный до постоянной массы фильтр с пористой пластинкой № 3. Для ускорения фильтрации и облегчения удаления лигнина с фильтра (по окончании анализа) применяют фильтрование под разряжением через фильтр с пористой пластинкой № 2, применяя при этом нафталиновую «подушку».

Нафталиновую «подушку» готовят следующим способом: 25г нафталина растворяют в 500 мл этилового спирта при нагревании в термостате при температуре  $40^\circ\text{C}$ , после чего раствор фильтруют через бумажный фильтр. В фильтрат добавляют 500 мл дистиллированной воды для выделения нафталина. 20—25 мл приготовленной смеси переносят на пористую пластинку фильтра, сильно отсасывают и промывают дистиллированной водой до достижения прозрачности промывной воды.

Лигнин на фильтре промывают горячим раствором 0,5 г/л хлористого натрия до полного удаления следов кислоты. Промывку производят при слабом вакууме, который постепенно увеличивают.

Фильтр с остатком лигнина высушивают в сушильном шкафу при температуре  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  до постоянной массы.

*Обработка результатов.*

Массовую долю лигнина ( $X$ ) в процентах к абсолютно сухой пробе вычисляют по формуле

$$X = \frac{(L - A)(100 - B)100}{E(100 - B)},$$

где  $L$  — масса лигнина, г;

$A$  — масса золы, содержащейся в лигнине, г (если массовая доля золы не определяется,  $A=0$ );

$B$  — массовая доля экстрагируемых веществ, %;

$E$  — масса экстрагированной воздушной сухой пробы, г;

$V$  — влажность пробы, %.

Результат единичного определения выражают с точностью на порядок выше, чем округляют окончательный результат испытания.

За результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, округленное до 0,1%.

Содержание сырого жира в сырье и полученных кормовых продуктах определяют по ГОСТ 28178-89.

**Метод определения массовой доли липидов<sup>1</sup>.**

Сущность метода заключается в экстракции липидов смесью органических растворителей из предварительно обработанного раствором соляной кислоты при нагревании продукта и гравиметрическом определении суммы экстрагированных веществ после удаления растворителя.

*Проведение испытания.*

В круглодонную или плоскодонную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> отвешивают 2,0 г продукта (результат записывают с точностью до второго десятичного знака). В колбу добавляют 2 см<sup>3</sup> этилового спирта и содержимое

---

<sup>1</sup> ГОСТ 28178-89. Дрожжи кормовые. Методы испытаний. – введ. 01.07.90. – М. : Стандартинформ, 2007. – 52 с. : ил.

колбы перемешивают встряхиванием. Добавляют 10 см<sup>3</sup> разбавленной водой соляной кислоты (2:1) и содержимое колбы вновь тщательно перемешивают.

Колбу соединяют с обратным холодильником и реакционную смесь нагревают на водяной бане при температуре (75±2) °С в течение 1 ч. Затем в колбу через холодильник добавляют 10 см<sup>3</sup> этилового спирта, колбу снимают с бани и оставляют для охлаждения. Допускается охлаждать колбу в бане с холодной водой или под струей холодной воды.

Содержимое колбы переливают в делительную воронку, остатки гидролизата в колбе вместе с твердой фазой смывают в ту же делительную воронку 25 см<sup>3</sup> этилового эфира. Воронку закрывают пробкой и энергично встряхивают, придерживая пробку одной рукой, а кран на спускной трубке — другой. Затем делительную воронку переворачивают краном вверх и осторожно открывают кран, выпуская образовавшиеся пары эфира. Кран делительной воронки закрывают, воронку энергично встряхивают в течение 30 с, переворачивают пробкой вверх, пробку вынимают и в воронку добавляют 25 см<sup>3</sup> петролейного эфира. Воронку закрывают пробкой и содержимое воронки вновь энергично встряхивают в течение 30 с, используя описанный выше прием для удаления образовавшихся паров эфира. Затем воронку укрепляют в штативе и оставляют для расслаивания жидкостей. В случае образования устойчивой эмульсии к смеси в делительной воронке добавляют 10—15 см<sup>3</sup> этилового спирта, содержимое воронки встряхивают и оставляют для расслаивания.

После расслаивания отделяют нижний кислотный слой, сливая его обратно в круглодонную или плоскодонную колбу, а верхний эфирный слой переливают в чистую делительную воронку.

Экстракцию липидов из кислотного слоя повторяют еще дважды, как описано выше, используя каждый раз смесь 15 см<sup>3</sup> этилового эфира и 15 см<sup>3</sup> петролейного эфира; при плохом расслаивании добавляют 10—15 см<sup>3</sup> этилового спирта.

По окончании экстракции реакционную смесь вместе с твердой фазой отбрасывают, а объединенный экстракт в делительной воронке промывают

дистиллированной водой дважды порциями по 20 см<sup>3</sup>. Затем экстракт упаривают в 2—3 приема на ротационном испарителе при остаточном давлении не ниже 50 мм рт. ст. и температуре водяной бани не более 35 °С, перенося экстракт из делительной воронки порциями по 60—60 см<sup>3</sup> в предварительно взвешенную круглодонную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> (результат взвешивания записывают с точностью до четвертого десятичного знака). Когда весь растворитель испарится, в колбу добавляют 20 см<sup>3</sup> ацетона и растворитель вновь упаривают. Допускается проводить отгонку растворителя обычным способом с дефлегматором.

После испарения растворителя колбу с липидами помещают в сушильный шкаф, нагретый до температуры (105±2) °С, и выдерживают при этой температуре в течение 30 мин. Затем колбу переносят в эксикатор и после охлаждения до комнатной температуры взвешивают (результат записывают с точностью до четвертого десятичного знака).

Колбы вновь помещают в сушильный шкаф для повторного высушивания в течение 15 мин и после охлаждения в эксикаторе взвешивают. Высушивание повторяют до достижения постоянной массы.

Массу считают постоянной, если разница между двумя последовательными взвешиваниями составит не более 0,004 г.

Проводят два параллельных определения.

*Обработка результатов.*

Массовую долю липидов ( $X$ ) в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{(m_1 - m_0) \times 100}{m(1 - 0,01 \times W)},$$

где  $m_1$  — масса колбы с липидами после высушивания, г;

$m_0$  — масса пустой колбы, г;

$m$  — масса навески продукта, г;

$W$  — массовая доля влаги в продукте, %.

Результат округляют до второго десятичного знака.

Из результатов двух параллельных определений вычисляют среднее арифметическое значение с тем же числом знаков после запятой и определяют

расхождение между каждым результатом и средним арифметическим значением. Допускаемое относительное расхождение не должно превышать 5%, округленных до целого числа.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, которое округляют до первого десятичного знака.

Допускаемое относительное расхождение между окончательными результатами, полученными в разных условиях (в разных лабораториях, в разное время, при работе с разным оборудованием, с разными материалами и реактивами), вычисляют следующим образом: из окончательных результатов испытаний, полученных в разных условиях, определяют среднее арифметическое значение, которое округляют до первого десятичного знака. Далее определяют расхождение между каждым окончательным результатом испытания и средним арифметическим значением. Допускаемое относительное расхождение не должно превышать 10%, округленных до целого числа.

Содержание редуцирующих веществ в сырье и полученных продуктах определяли по ГОСТ 12575-2001 и фотометрическим способом.

**Йодометрический метод определения редуцирующих веществ с применением реактива Мюллера<sup>1</sup>.**

Метод основан на восстановлении ионов меди ( $\text{Cu}_2^+$ ) из щелочного раствора Мюллера до гемеоксида меди ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) редуцирующими веществами при добавлении избыточного количества раствора йода и титровании избытка его раствором тиосульфата натрия.

#### *Проведение испытания*

Отбирают 20 см<sup>3</sup> исходного раствора, что соответствует 2 г сахара-сырца, или 50 см<sup>3</sup> исходного раствора, что соответствует 10 г сахара-песка или сахара-рафинада.

---

<sup>1</sup> ГОСТ 12575-2001. Сахар. Методы определения редуцирующих веществ. – Взамен ГОСТ 12575-86 ; введ. 01.01.2003. – Минск : ИПК Изд-во стандартов, 2002. – 15 с.

Если содержание редуцирующих веществ во взятом объеме раствора сахара-сырца превышает 25 г, отбирают меньший объем раствора.

Раствор помещают в коническую колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup> (при анализе сахара-сырца содержимое колбы нейтрализуют раствором уксусной кислоты молярной концентрации  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 5$  моль/дм<sup>3</sup> в присутствии индикатора фенолфталеина). Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 см<sup>3</sup>, прибавляют 10 см<sup>3</sup> реактива Мюллера, перемешивают и помещают колбу с раствором в кипящую водяную баню на 10 мин  $\pm$  5 с. Уровень воды в бане должен быть на 2 см выше уровня раствора в конической колбе. Колба должна быть помещена на подставке так, чтобы она не касалась дна бани. Баня должна иметь такие размеры, чтобы кипение не прерывалось при помещении в нее колбы. После нагревания коническую колбу, накрытую часовым стеклом, во избежание окисления окиси меди кислородом воздуха быстро охлаждают под струей холодной воды без взбалтывания.

После кипячения раствор должен иметь голубовато-зеленоватую окраску. Если раствор оранжевой окраски, опыт повторяют с меньшим количеством фильтрата.

К охлажденному раствору прибавляют 5 см<sup>3</sup> раствора уксусной кислоты молярной концентрации  $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 5$  моль/дм<sup>3</sup> и сразу же раствор йода молярной концентрации  $c(1/2 \text{I}_2) = 0,0333$  моль/дм<sup>3</sup> в количестве от 20 до 40 см<sup>3</sup>. Оба раствора добавляют без взбалтывания во избежание окисления окиси меди кислородом воздуха.

Колбу закрывают и содержимое взбалтывают до полного растворения осадка, при этом раствор имеет коричневую окраску, обусловленную избытком йода, и оставляют на 2 мин. Затем добавляют 2 см<sup>3</sup> раствора крахмала массовой долей 1 % и титруют раствором тиосульфата натрия молярной концентрации  $c(1/2 \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,0333$  моль/дм<sup>3</sup> до исчезновения синей окраски раствора.

Проводят контрольное определение, используя те же реактивы и в тех же количествах, но вместо испытуемого раствора добавляют дистиллированную

воду. Контрольное определение проводят для каждого свежеприготовленного реактива Мюллера.

Параллельно проводят опыт без нагревания, используя то же количество исходного раствора и те же реактивы (после добавления реактива Мюллера раствор оставляют на 10 мин).

#### *Обработка результатов*

При вычислении массовой доли редуцирующих веществ принимают, что 1 см<sup>3</sup> раствора йода (0,0333 моль/дм<sup>3</sup>) соответствует 1 мг редуцирующих веществ.

Массовую долю редуцирующих веществ в сахаре  $X_1$ , %, вычисляют по формуле

$$X_1 = \frac{(V_1 \cdot K_1 - V_2 \cdot K_2) - K}{m \cdot 1000} \cdot 100 ,$$

где  $V_1$  — количество раствора йода, израсходованное на испытание, см<sup>3</sup>;

$V_2$  — количество раствора тиосульфата натрия, израсходованное на титрование, см<sup>3</sup>;

$K_1$  — поправочный коэффициент раствора йода;

$K_2$  — поправочный коэффициент раствора тиосульфата натрия;

$K$  — сумма поправок на расход раствора йода на восстановление сахарозы (из расчета 0,2 см<sup>3</sup> на 1 г), на расход раствора йода при определении без нагревания, на редуцирующую способность реактива Мюллера;

100 — коэффициент перерасчета в проценты;  $m$  — масса навески, г;

1000 — коэффициент перерасчета граммов в миллиграммы.

Сумму поправок  $K$ , см<sup>3</sup>, вычисляют по формуле

$$K = \frac{0,2 \cdot m \cdot X}{100} + (V_1 \cdot K_1 - V_{2M} \cdot K_2) + (V_1 \cdot K_1 - V_{2БН} \cdot K_2) ,$$

где 0,2 — расход раствора йода на восстановление 1 г сахарозы, см<sup>3</sup>/г;

$m$  — масса навески, г;

$X$  — массовая доля сахарозы, %;

$V_1$  — количество раствора йода, см<sup>3</sup>;

$K_1$  — поправочный коэффициент раствора йода;

$V_{2M}$  — количество раствора тиосульфата натрия, израсходованное на титрование при контрольном определении, см<sup>3</sup>;

$K_2$  — поправочный коэффициент раствора тиосульфата натрия;

$V_{2BH}$  — количество раствора тиосульфата натрия, израсходованное на титрование в опыте без нагревания, см<sup>3</sup>.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 0,01 % в абсолютном значении. Если расхождение превышает эту величину, испытание повторяют.

Вычисление проводят с точностью до второго десятичного знака.

Расхождение между результатами определения, выполненными в двух разных лабораториях, не должно превышать 0,02 % в абсолютном значении. Допустимая относительная погрешность результата анализа 0,45 % при доверительной вероятности 0,95.

### **Способ определения содержания редуцирующих веществ (РВ) в сахаросодержащих средах<sup>1</sup>.**

Для определения редуцирующих веществ по предлагаемому методу предварительно готовят растворы:

раствор 1 - раствор сульфата меди (II) с концентрацией 11,06 г/л  $\text{CuSO}_4$ ;

раствор 2 - раствор, содержащий сегнетовую соль, желтую кровяную соль и гидроксид натрия с концентрацией 50; 3,5; 75 г/л соответственно;

раствор 3 готовят методом разбавления анализируемого раствора в R раз.

Для этого в мерную колбу на 100 мл вносят известный объем анализируемого раствора ( $V_{ан}$ , мл) и объем раствора доводят до метки дистиллированной водой.

---

<sup>1</sup> Пат. 2366931 Российская Федерация, МПК<sup>7</sup> G 01 N 21/78. Способ определения содержания редуцирующих веществ в сахаросодержащих средах / Ю.Г. Хабаров, В.А. Вешняков, Н.Д. Камакина ; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО Архангельский гос. технический университет Федерального агентства по образованию (Рособразование) (АГТУ). – № 2008108650/04 ; заявл. 05.03.08 ; опубл. 10.09.09, Бюл. № 25. – 7 с.

Предварительно строят калибровочный график по глюкозе. Для этого готовят водные растворы глюкозы с концентрацией ( $C_{\text{гл}}$ ) 0; 0,5; 1,0; 1,5 мг/мл. Затем в пробирке смешивают по 2 мл растворов 1 и 2 и раствора глюкозы с заданной концентрацией. После чего пробирку нагревают на кипящей водяной бане в течение 3 мин, по истечении которых смесь фотометрируют на фотоколориметре при 670 нм относительно дистиллированной воды в кюветах с толщиной рабочего слоя 1 см.

Результат определения - оптическая плотность (D).

Результаты определения оптической плотности (D) для растворов глюкозы с заданными концентрациями приведены ниже.

Концентрация глюкозы, мг/мл	Оптическая плотность при 670 нм
0	0,639
0,5	0,488
1,0	0,337
1,5	0,199

На основании результатов, представленных в таблице, были вычислены коэффициенты калибровочного графика:

$$D = -0,2945 C_{\text{гл}} + 0,6366, (R^2 = 0,9996).$$

Для определения РВ в пробирке смешивают по 2 мл раствора 1, 2 и 3. Затем пробирку нагревают на кипящей водяной бане в течение 3 мин, по истечении которых смесь фотометрируют на фотоколориметре при 670 нм относительно дистиллированной воды в кюветах с толщиной рабочего слоя 1 см. Результат определения - оптическая плотность (D).

Параллельно проводят холостое определение, при котором реакцию смесь не нагревают и фотометрируют сразу же после приготовления. Результат определения - оптическая плотность ( $D_0$ ).

На основании результатов контрольного и холостого определения вычисляют содержание РВ в расчете на глюкозу, мг/мл:

$$РВ = R(D_0 - D + 0,012) / 0,2945.$$

Растворимые сухие вещества (РСВ) в полученных продуктах определяли по ГОСТ Р 51433-99.

## **Метод определения содержания растворимых сухих веществ рефрактометром<sup>1</sup>.**

Содержание растворимых сухих веществ, определяют с помощью рефрактометра; найденное значение выражают в единицах массовой доли сахарозы в водном растворе сахарозы, имеющем в заданных условиях такой же показатель преломления, как и анализируемый раствор, в процентах (° Брикса). Показатель преломления исследуемого продукта зависит от присутствия в нем, помимо сахаров, других растворимых веществ – органических кислот, минеральных веществ, аминокислот и пр. Для цитрусовых и концентрированных цитрусовых соков с высоким содержанием кислот и в других аналогичных случаях в найденное значение ° Брикса вносят поправку.

### *Подготовка к проведению измерений*

Воду для лабораторного анализа, используемую при калибровке рефрактометра, дегазируют кипячением непосредственно перед использованием.

Перед каждой серией измерений рефрактометр должен быть откалиброван с использованием стандартных растворов в соответствии с инструкцией.

Перед проведением калибровки, также как и перед проведением других измерений, поверхность стеклянных призм рефрактометра очищают водой, остатки влаги удаляют фильтровальной бумагой.

Массовую долю растворимых сухих веществ в соках определяют при окружающей температуре ( $20 \pm 0,5$ ) °С. Если рефрактометр снабжен средством регулирования температуры, то измерения допускается проводить при температуре от 10 до 30 °С, соблюдая инструкцию по эксплуатации прибора. Если рефрактометр не снабжен средством регулирования температуры, то измерения допускается проводить при температуре от 15 до 25 °С. В полученное значение вносят температурную поправку.

---

<sup>1</sup> ГОСТ Р 51433-99. Соки фруктовые и овощные. Метод определения содержания растворимых сухих веществ рефрактометром. – введ. 01.01.01. – М. : Стандартинформ, 2008. – 7 с.

### *Проведение измерений*

Небольшую порцию пробы продукта помещают на нижнюю призму рефрактометра. Следят за тем, чтобы исследуемый продукт равномерно покрыл стеклянную поверхность, после чего накрывают нижнюю призму верхней призмой. Ждут, пока не будет достигнуто температурное равновесие (примерно 30 с), и затем проводят измерения в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора. Важно, чтобы температура сохранялась постоянной в течение всего процесса измерений.

Определяют по шкале прибора массовую долю сахарозы в процентах до первой десятичной знака.

Проводят два параллельных определения.

### *Обработка и оформление результатов*

Содержание растворимых сухих веществ выражают в процентах или ° Брикса. Значение показателя считывают непосредственно со шкалы прибора.

Расхождение между результатами двух измерений, полученными при анализе одной и той же пробы продукте, одним лаборантом на одном и том же оборудовании за возможно минимальный интервал времени, не должно превышать норматива оперативного контроля сходимости 0,15 % (° Брикса) при испытаниях соков и напитков и 0,2 % (° Брикса) при испытаниях концентрированных соков ( $P = 0,95$ ). При соблюдении этого условия за окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, округленное до первого десятичного знака.

Расхождение между результатами двух измерений, полученными при анализе одной и той же пробы продукта в двух различных лабораториях, не должно превышать норматива оперативного контроля воспроизводимости 0,42 % (° Брикса) при испытаниях соков и напитков и 0,6 % (° Брикса) при испытаниях концентрированных соков ( $P = 0,95$ ).

Пределы абсолютной погрешности определения содержания растворимых сухих веществ при соблюдении всех условий, регламентируемых

настоящим стандартом, не превышают для соков и напитков  $\pm 0,3$  % ( $^{\circ}$  Брикса), для концентрированных соков  $\pm 0,4$  % ( $^{\circ}$  Брикса) ( $P = 0,95$ ).

Ферментативную активность целлюлазы в культуральной жидкости определяли по ГОСТ Р 53046-2008.

**Метод определения ферментативной активности целлюлазы с использованием субстрата хроматографической бумаги<sup>1</sup>.**

#### *Характеристика метода*

Метод основан на количественном определении восстанавливающих Сахаров, образующихся в результате гидролиза целлюлозы хроматографической бумаги под действием ферментов целлюлолитического комплекса.

За единицу целлюлолитической активности (1 ед. ЦЛА) принято количество ферментов, которое катализирует гидролиз целлюлозы хроматографической бумаги с образованием 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу) за 1 час при температуре 50  $^{\circ}$ С и рН 4.7.

Содержание восстанавливающих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом с использованием реактива калия железосинеродистого (красной кровяной соли, калия феррицианида, калия гексацианоферрата) и рассчитывают по градуировочному графику, построенному для глюкозы. Диапазон измерений контролируемого показателя 0,5 – 25,0 ед. ЦЛА.

*Приготовление стандартных растворов глюкозы при определении по методу с железосинеродистым калием*

Для приготовления стандартных растворов глюкозы готовят основной стандартный раствор концентрации 1 мкмоль/см<sup>3</sup> (180 мкг/см<sup>3</sup>). Для этого навеску безводной глюкозы массой 90 мг, взятую с точностью до 0,2 мг, вносят в мерную колбу вместимостью 500 см<sup>3</sup>, растворяют о небольшом количестве

---

<sup>1</sup> ГОСТ Р 53046-2008. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы. – введ. 01.01.10. – М. : Стандартинформ, 2009. – 12 с.

буферного раствора (от 30 до 50 см<sup>3</sup>), доводят объем до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Из основного стандартного раствора глюкозы готовят серию разведений в соответствии с нижеприведенной таблицей.

Объем стандартного раствора с молярной (массовой) концентрацией глюкозы 1 мкмоль/см <sup>3</sup> , см <sup>3</sup>	Объем буферного раствора, см <sup>3</sup>	Концентрация глюкозы в разведении	
		массовая, мкг/см <sup>3</sup>	молярная, мкмоль/см <sup>3</sup>
2	8	36	0.20
3	7	54	0.30
4	6	72	0.40
5	5	90	0.50
6	4	108	0.60
7	3	126	0,70
8	2	144	0.80

Стандартные растворы глюкозы готовят в день построения градуировочного графика из трех параллельных навесок.

Для построения градуировочного графика вносят в серию пробирок по 2 см<sup>3</sup> разведений стандартного раствора глюкозы и добавляют 6 см<sup>3</sup> раствора гексацианоферрата калия. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 10 мин, затем вынимают и охлаждают до комнатной температуры. Измеряют оптическую плотность окрашенных растворов при длине волны 400—440 нм и толщине поглощающего слоя 10 мм против дистиллированной воды.

На основании полученных результатов строят градуировочный график зависимости значений оптической плотности от концентрации глюкозы (мкмоль/ см<sup>3</sup>). По оси абсцисс откладывают молярные концентрации глюкозы мкмоль/ см<sup>3</sup>, по оси ординат — оптические плотности в единицах ОП. График имеет обратную линейную зависимость. Рабочая зона градуировочного графика лежит в пределах от 0,3 до 0,6 мкмоль/см<sup>3</sup> глюкозы, что соответствует поглощению в единицах оптической плотности от 0,50 до 0,65 ед. ОП.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности трех параллельных измерений.

Для приготовления основного раствора ферментного препарата берут его навеску массой от 0,1 до 10 г с точностью до 0,2 мг и суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды (до 50 см<sup>3</sup>) на магнитной мешалке в течение 15 - 60 мин. Суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup> и доводят объем дистиллированной водой до метки. Полученную суспензию центрифугируют при частоте вращения 7000 мин<sup>-1</sup> в течение 15 мин. Для анализа используют надосадочную жидкость.

Рабочий раствор готовят из основного раствора ферментного препарата путем его разведения в дистиллированной воде (например, в 10 раз) таким образом, чтобы при определении активности оптические плотности опытного и контрольного растворов находились в пределах рабочей зоны градуировочного графика.

#### *Проведение анализа*

Анализ проводят в двух параллельных определениях.

В три пробирки (две опытные и одна контрольная) помещают по полоске бумаги для хроматографии массой 98 – 102 мг (размером 1,5×8,0 см), сложенной гармошкой, заливают 2 см<sup>3</sup> ацетатного буферного раствора и перемешивают. Пробирки закрывают пробками, помещают в ультратермостат с температурой (50 ± 1) °С и выдерживают в течение 10 мин.

В две опытные пробирки добавляют по 2 см<sup>3</sup> рабочего раствора ферментного препарата с той же температурой и перемешивают. Все три пробирки помещают в ультратермостат с температурой (50 ± 1) °С и выдерживают в течение 60 мин.

После проведения гидролиза из двух пробирок (опытные пробы) отбирают по 2 см<sup>3</sup> реакционной смеси в чистые пробирки. В третью пробирку (контрольную) вносят 2 см<sup>3</sup> основного раствора препарата фермента, перемешивают и сразу же отбирают 2 см<sup>3</sup> смеси в чистую пробирку.

Во все три пробирки добавляют по 6 см<sup>3</sup> раствора калия гексацианоферрата. Пробирки закрывают пробками и кипятят в водяной бане

ровно 10 мин (по секундомеру), после чего быстро охлаждают до комнатной температуры.

Измеряют оптическую плотность содержимого всех трех пробирок против дистиллированной воды при длине волны 400 – 420 нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм.

Показатели оптических плотностей в опытных и контрольной пробах должны соответствовать значениям от 0,50 до 0,65 ед. ОП. В случае, если ОП опытных проб меньше 0,5, то основной раствор дополнительно разводят, если больше 0,65 — берут меньшее разведение основного раствора. Обыкновенно опытные пробы в сравнении с контрольной имеют в 10 раз большее разведение.

#### *Обработка результатов*

Молярную концентрацию глюкозы (в мкмоль/см<sup>3</sup>) в опытных и контрольном растворах определяют по градуировочному графику.

Целлюлолитическую активность  $C_{лА}$ , ед/г, при определении с феррицианидом калия вычисляют по формуле

$$C_{лА} = \frac{C_0 - C_k}{tc},$$

где  $C_0$  — молярная концентрация глюкозы в опытной пробе в соответствии с градуировочным графиком, мкмоль/см<sup>3</sup>;

$C_k$  — молярная концентрация глюкозы в контрольной пробе в соответствии с градуировочным графиком, мкмоль/см<sup>3</sup>;

$p$  — коэффициент разведения рабочего раствора препарата по отношению к контрольному (основному) раствору;

$t$  — продолжительность гидролиза, ч;

$c$  — массовая концентрация ферментного препарата в реакционной смеси, г/см<sup>3</sup>, по формуле

$$c = \frac{m}{VP2},$$

где  $m$  — масса навески ферментного препарата, г;

$V$  — объем разведения навески при приготовлении основного раствора, см<sup>3</sup>;

$P$  — разведение основного раствора ферментного препарата для приготовления рабочего раствора;

2 — разведение рабочего раствора в реакционной смеси.

За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до первого десятичного знака ( $\bar{X} \pm \Delta$ ), ед/г, при доверительной вероятности  $P = 0,95$ , где  $\Delta = 0,01 \delta \times \bar{X}$ . Границы погрешности  $\delta = \pm 7 \%$ .

«сырую» золу – методом сухого озоления (температура 400 – 450°C) по ГОСТ 26226-95.

### **Весовой метод определения сырой золы (первый)<sup>1</sup>.**

Сущность метода заключается в определении массы остатка после сжигания и последующего прокаливания пробы.

#### *Подготовка к испытанию*

Объединенные пробы сена, силоса, сенажа или зеленых кормов измельчают на отрезки длиной 1 - 3 см. Корнеплоды и клубнеплоды и мельчают на пластинки (ломтики) толщиной до 0,8 см.

Из объединенной пробы выделяют среднюю пробу, масса которой после высушивания должна быть не менее 100 г. Пробы высушивают в сушильном шкафу при температуре 61 - 65 °С до воздушно-сухого состояния. Воздушно-сухую пробу измельчают на мельнице и просеивают через сито. Трудно измельчаемый остаток на сите после измельчения ножницами или в ступке добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Средние пробы комбикормов, зерна, жмыхов, шротов, гранул травинной и витаминной муки из древесной зелени размалывают и просеивают через сито

---

<sup>1</sup> ГОСТ 26226-95. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения сырой золы. – Взамен ГОСТ 26226-84 ; введ. 01.01.97. – Минск : ИПК Издательство стандартов, 2003. – 8 с.

без предварительного подсушивания или в случае необходимости после предварительного высушивания до воздушно-сухого состояния.

Подготовленные для испытаний пробы хранят в стеклянной или пластмассовой банке в сухом месте.

Тигель прокаливают в печи при температуре  $(525 \pm 25)$  °С в течение 2 ч, охлаждают в эксикаторе и взвешивают на весах 2-го класса точности. Этот процесс повторяют (прокаливая тигель в течение 30 мин) до достижения постоянной массы тигля, т. е. разность результатов двух последовательных взвешиваний не должна превышать 0,001 г. Прокаленный и доведенный до постоянной массы тигель хранят в эксикаторе над хлористым кальцием.

#### *Проведение испытания*

В тигель, высушенный до постоянной массы, помещают испытуемую пробу массой около 0,5 - 2 г (количество определяемой дозы: должно составлять не менее 50 мг). Пробу укладывают в тигель без уплотнения для того, чтобы в ее нижние слои поступал кислород воздуха. Пробой заполняют не более половины тигля.

Тигель с пробой взвешивают с точностью до 0,001 г, затем его помещают в холодную печь и повышают температуру до 200 - 250 °С (до появления дыма). Допускается проводить предварительное сжигание пробы у открытой дверцы муфеля, нагретого до темно-красного каления  $(525 \pm 25)$  °С на электрической плитке или газовой горелке, в вытяжном шкафу, избегая воспламенения пробы.

После прекращения выделения дыма температуру печи доводят до  $(525 \pm 25)$  °С и прокаливают тигель с пробой в течение 4 - 5 ч. Отсутствие частичек угля и равномерный серый цвет золы указывают на полное озоление материала.

При наличии частиц угля тигель с золой охлаждают на воздухе, прибавляют несколько капель дистиллированной воды и 1 - 2 см<sup>3</sup> 3 %-ного раствора перекиси водорода. Содержимое тигля выпаривают (в сушильном шкафу, на электроплитке или другим способом), тигель помещают и печь и

прокаливают при температуре  $(525 \pm 25)$  °С в течение 1 ч. По окончании прокаливания тигель с золой охлаждают в выключенной печи, затем в эксикаторе и взвешивают. В случае необходимости дальнейшее прокаливание тигля с золой при вышеуказанной температуре проводят в течение 30 мин, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Постоянство массы считается достигнутым, если разность результатов двух последовательных взвешиваний составляет не более 0,001 г.

#### *Обработка результатов*

Массовую долю сырой зоны ( $X$ ) в процентах в испытуемой пробе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100,$$

где  $m_0$  - масса тигля, г;

$m_1$  - масса тигля с пробой до озоления, г;

$m_2$  - масса тигля с золой, г.

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений.

Результаты вычисляют до второго десятичного знака и округляют до первого десятичного знака. Допускаемые расхождения между результатами двух параллельных определений ( $d_{abc}$ ) и между двумя результатами, полученными в разных условиях ( $D_{abc}$ ) при доверительной вероятности  $P = 0,95$  не должны превышать следующих значений:

$$d_{abc} = 0,028\bar{X} + 0,11;$$

$$D_{abc} = 0,064\overline{\bar{X}} + 0,083,$$

где  $\bar{X}$  - среднеарифметическое результатов двух параллельных определений, %;

$\overline{\bar{X}}$  - среднеарифметическое результатов двух определений, выполненных в разных условиях, %.

Предельную погрешность результата испытания ( $\Delta_{abc}$ ) при односторонней доверительной вероятности  $P = 0,95$  вычисляют по формуле:

$$\Delta_{abc} = 0,038 \bar{\bar{X}} + 0,049.$$

Предельную погрешность результата испытания используют при оценке качества кормов. Допускается проведение анализа без параллельных определений при наличии в партии исследуемых проб стандартных образцов (СО). Если разница между воспроизведенной и аттестованной в СО массовой долей сырой золы ( $\bar{D}$ ) не превышает

$$\bar{D} = 0,045 X_{\text{атт}} + 0,059,$$

где  $\bar{D}$  - допускаемое отклонение среднего результата анализа от аттестованного значения компонента, %;

$X_{\text{атт}}$  — аттестованное значение анализируемого компонента, взятое из свидетельства па СО, в этом случае (при обязательном проведении выборочного статистического контроля сходимости параллельных) за результат испытания принимают результат единичного определения. Контрольные анализы образцов испытуемой партии и анализы СО проводят в 2 параллельных определениях.

Массовую долю сырой золы в процентах в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{X100}{100 - W},$$

где  $X$  - массовая доля сырой золы в испытуемой пробе, %,

$W$  - влажность испытуемой пробы, %.

Общую токсичность полученных кормовых добавок определяли с помощью биологической пробы на белых мышах (ГОСТ 28178-89) и с помощью тест-культуры инфузории *Tetrahymena pyriformis* на стандартной питательной среде по ГОСТ 13496.7-97.

### **Определение токсичности на белых мышах<sup>1</sup>.**

#### *Подготовка к испытанию*

---

<sup>1</sup> ГОСТ 28178–89. Дрожжи кормовые. Методы испытаний. – введ. 01.07.90. – М. : Стандартинформ, 2007. – 52 с. : ил.

Навеску продукта в количестве 10 г измельчают в фарфоровой ступке до пылевидного состояния, помещают в колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> с притертой пробкой, приливают 40 см<sup>3</sup> горячей дистиллированной воды (температура 65—70 °С) и встряхивают на шуттель-аппарате в течение 30—40 мин, затем суспензию центрифугируют при 3—5 тыс. об/мин в течение 15 мин или фильтруют через бумажный фильтр. Полученный экстракт (центрифугат) используют для приготовления суспензии. Для этого взвешивают 2,5 г измельченного испытуемого продукта, переносят в мерный стакан вместимостью 50 см<sup>3</sup> и доводят до объема 10 см<sup>3</sup> экстрактом (центрифугатом). Суспензию тщательно перемешивают или гомогенизируют в течение 2—3 мин.

#### *Проведение испытания*

Для опыта берут 5 белых мышей массой 18—20 г каждая, выдерживают без корма 4—5 ч, после чего с помощью шприца с зондом (тупая слегка загнутая игла) вводят однократно через рот в желудок 1 см<sup>3</sup> суспензии.

Наблюдают за мышами в течение 5 суток, не ограничивая их в корме и питье. Оставшихся в живых мышей убивают и вскрывают.

В качестве контроля белым мышам вводят по 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

#### *Обработка результатов*

Продукт не токсичный — мыши живы. На вскрытии у убитых мышей патологоанатомических изменений не обнаруживают.

Продукт слабо токсичный — мыши живы. На вскрытии у всех или у большинства (не менее трех) убитых мышей выявляют геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта, часто сопровождающееся дегенерацией печени, почек, кровоизлияниями в паренхиматозных органах.

В случае падежа одной мыши, если остальные живы и патологоанатомических изменений у них не обнаруживают, опыт повторяют.

## **Определение токсичности биопробой на инфузориях тетрахимена пириформис<sup>1</sup>.**

### *Сущность метода*

Метод основан на экстракции ацетоном из испытуемой пробы токсичных веществ, в основном микогенного происхождения, и последующем воздействии водных растворов этих фракций на инфузории тетрахимена пириформис.

### *Подготовка пробы*

Среднюю пробу корма при необходимости измельчают и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Навеску исследуемого корма около 50 г (зерно измельчают, комбикорма, отруби и другие рассыпные корма используют без измельчения) высыпают в плоскодонную колбу со шлифом, приливают 100 см<sup>3</sup> ацетона и экстрагируют на аппарате для встряхивания жидкостей в течение 1 ч. Затем раствор осторожно сливают через бумажный фильтр в колбу или чашку для выпаривания. Повторное экстрагирование проводят 50 см<sup>3</sup> экстрагента (ацетона) в течение 30 мин. Жидкость сливают через бумажный фильтр, промывают его от 10 до 20 см<sup>3</sup> экстрагента. Экстракты объединяют и выпаривают на водяной бане при температуре от 50 до 60 °С в вытяжном шкафу до полного испарения экстрагента.

После выпаривания вносят от 1 до 2 см<sup>3</sup> экстрагента, чтобы смыть маслянистый экстракт со стенок чашки, и приливают 10 см<sup>3</sup> пептоновой среды. Перемешивают и выпаривают содержимое до полного удаления запаха растворителя, фильтруют во флаконы и доводят до рН 7 - 7,5.

Параллельно, с целью определения качества растворителя и среды, готовят контрольный экстракт. Для этого проводят упаривание растворителя (без навески корма), внесение среды, доведение рН вышеизложенным способом.

### *Проведение испытаний*

---

<sup>1</sup> ГОСТ 13496.7-97. Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности. – Взамен ГОСТ 13496.7-92 ; введ. 01.11.2000. – Минск : ИПК Издательство стандартов, 2000. – 15 с.

Исследование каждой пробы проводят 3 раза.

В 3 флакона для антибиотиков вносят по 1 см<sup>3</sup> экстракта, приготовленного заранее, приливают 0,1 см<sup>3</sup> 3–5-суточной культуры инфузории тетрахимена пириформис и оставляют при комнатной температуре.

Через 30 и 60 мин подсчитывают эффект биопробы в капле, взятой пастеровской пипеткой, на предметном стекле под микроскопом (увеличение 7×10), просматривают весь объем капли и всех ее слоев.

В исследуемых пробах подсчитывают наличие живых и погибших инфузорий, что зависит от степени токсичности корма.

Наблюдение проводят на фоне контроля — пептоновая среда, все инфузории в контроле должны быть живыми. В случае гибели инфузорий контроль повторяют на новой среде и культуре.

#### *Обработка результатов*

Степень токсичности корма определяют по количеству живых инфузорий через 30 и 60 мин от начала испытаний:

- нетоксичный корм — гибели и никаких морфологических изменений в инфузориях не происходит в течение 60 мин наблюдений;
- слаботоксичный корм — морфологические изменения и частичная (от 25 % до 30 %) гибель инфузорий в течение 60 мин наблюдений;
- токсичный корм — гибель всех инфузорий в течение 60 мин наблюдений.

#### *Оформление результатов*

Результаты испытаний заносят в экспертный журнал и (или) оформляют акт экспертизы, где указывают степень токсичности корма и возможность его использования.

Нетоксичный корм дальнейшему исследованию не подлежит и используется по назначению.

Слаботоксичный и токсичный корм направляют на повторные испытания основным методом, а также на микологические и химико-токсикологические исследования.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета статистических программ Microsoft «Excel 2007».

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Изучение химического состава соломы зерновых культур как сырья для получения кормового белка

Солома зерновых культур - это целлюлозосодержащий материал, который обладает невысокой питательной ценностью и состоит, главным образом, из полисахаридов (таблица 1). Характерной особенностью химического состава и питательности соломы является высокое содержание клетчатки, очень небольшое количество протеина и жира, бедность минеральными веществами и почти полное отсутствие витаминов. Кроме того, солома в чистом виде плохо поедается скотом и имеет сравнительно низкую переваримость питательных веществ.

Питательные вещества соломы заключены в прочный лигнин-целлюлозный комплекс, который плохо разрушается в желудочно-кишечном тракте животных. Клетчатка соломы состоит на 35 – 45 % из целлюлозы, на 14 – 20 % - из лигнина, на 20 – 30 % - из пентозанов и на 3 – 5 % - из кремниевых солей. Чем выше содержание в соломе клетчатки, тем ниже ее кормовое достоинство.

Таблица 1 - Химический состав соломы зерновых культур

показатели	содержание, % а.с.в.	
	солома пшеницы	солома гречихи
Целлюлоза	41,52±0,4	38,2±0,78
Гемицеллюлоза	23,23±0,13	20,89±0,17
Лигнин	21,37±0,81	20,51±1,01
Сырая клетчатка	34,02±0,84	44,95±1,28
Сырой протеин	4,52±0,09	2,95±0,08
Сырой жир	1,46±0,17	1,18±0,01
Сырая зола	4,14±0,04	2,19±0,12

Изучение органического состава соломы исследуемых сортов зерновых культур показало, что ее можно рассматривать как перспективное целлюлозосодержащее сырьё, потенциально обладающее высокой пищевой ценностью. Разработка экологически безопасных биотехнологических

процессов конверсии этого вида сырья способствует получению ряда ценных целевых продуктов направленного действия.

### **3.2. Исследование способов предподготовки исследуемого целлюлозосодержащего сырья**

Известно, что гидролиз целлюлозы до глюкозы можно осуществить двумя способами: химическим и ферментативным, более перспективным из которых является последний.

Методы химической обработки соломы многочисленны и разнообразны. Большинство их заключается в обработке известью, едкими щелочами, каустической содой, серной кислотой, жидким диоксидом углерода и др<sup>1</sup>.

В результате гидролиза (превращения полисахаридов сырья в моносахариды) получают гидролизаты (водные растворы органических веществ, главным образом пентоз и гексоз), а также гидролизный лигнин (выход около 30%). Поскольку на скорость и степень гидролиза полисахаридов влияет размер частиц сырья, его предварительно измельчают (рисунок 2).



Рисунок 2 – Измельченная в лабораторной мельнице ЛЗМ солома яровой мягкой пшеницы (размер частиц 0,5 – 2 мм)

В промышленности большое распространение получили химические методы гидролиза, однако они имеют ряд существенных недостатков,

---

<sup>1</sup> Santos, A.L.F. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide / A.L.F. Santos, K.Y.F. Kawase, G.L.V. Coelho // The Journal of Supercritical Fluids. – 2011. – Vol. 56, № 3. – P. 277 – 282.

главными из которых являются необходимость применения дорогостоящих химических реактивов, утилизация отходов.

В свою очередь ферментативный гидролиз является экологически чистой технологией основанной на природных процессах и механизмах конверсии веществ целлюлолитическими ферментами микробного происхождения.

Объектом исследования являлись образцы соломы яровой мягкой пшеницы, структура которых представлена на рисунках 3 – 5. Цель исследований состояла в изучении изменения структуры образцов после предварительной обработки и выборе оптимального режима термогидролиза.

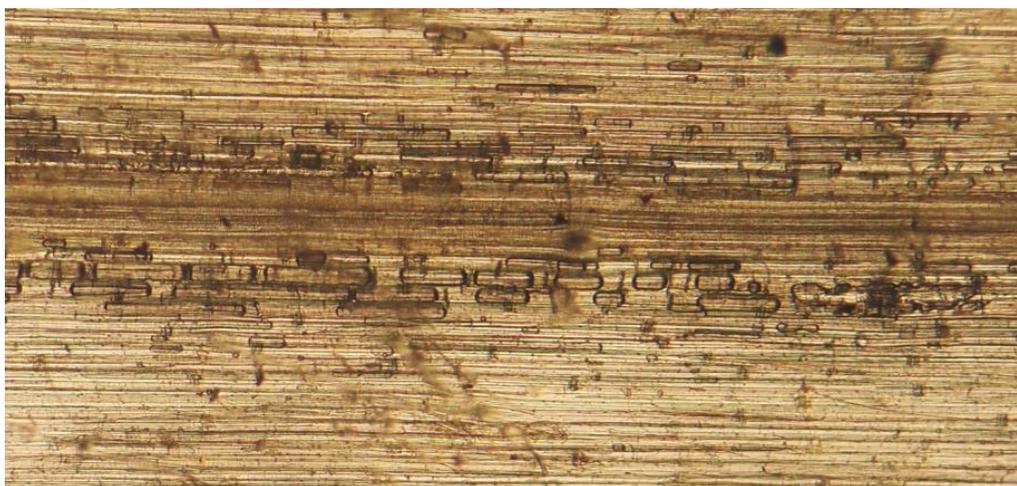


Рисунок 3 - Структура нативной соломы пшеницы (увеличение  $\times 400$ ).

На рисунке 3 изображена структура нативной соломы пшеницы, хорошо видны ориентированные в пространстве волокна, жестко скрепленные, отсутствуют продольные и поперечные разрывы. Такая прочность соломины обусловлена скрученными элементарными волокнами, наличием цементирующего лигнина и покрытием с внешней стороны жирами и восками, защищающими соломину от любого воздействия.

После термообработки при температуре  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , давлении  $1,0\text{ атм}$ , в течение  $1,5$  часов пространственная ориентация волокон нарушается, видны незначительные продольные разрывы получены единичные волокна целлюлозы (рис. 4).

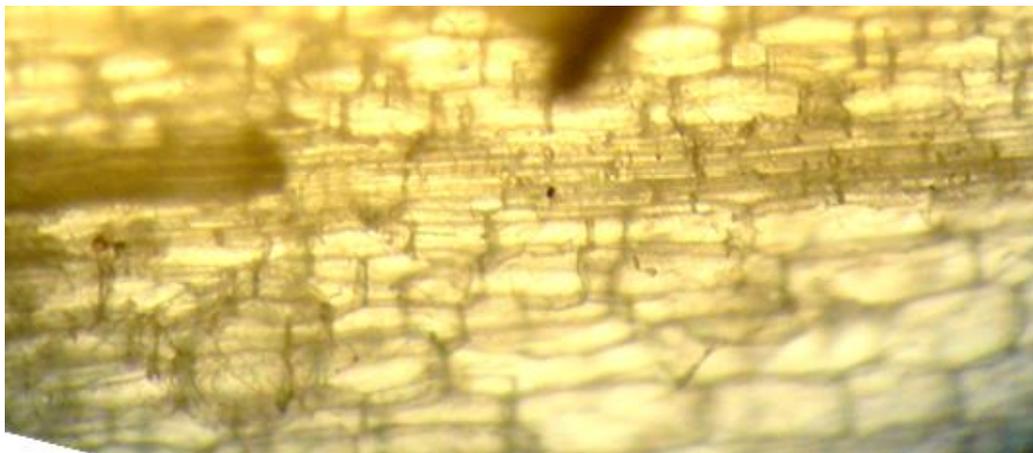


Рисунок 4 - Структура соломы пшеницы после термообработки: температура 100 °С, давление 1,0 атм, время 1,5 ч (увеличение ×400).

Анализ результатов структуры пшеничной соломы показал изменчивость волокнистой части соломы и после термообработки при температуре 121 °С, давлении 2 атм, в течение 0,25 часа. Однако большего разрыхления волокна не наблюдалось, как ожидалось, и на рисунке 5 видно, что пространственная ориентация волокон практически не изменяется, однако происходит разрушение лигнинового слоя, заметны незначительные продольные разрывы.

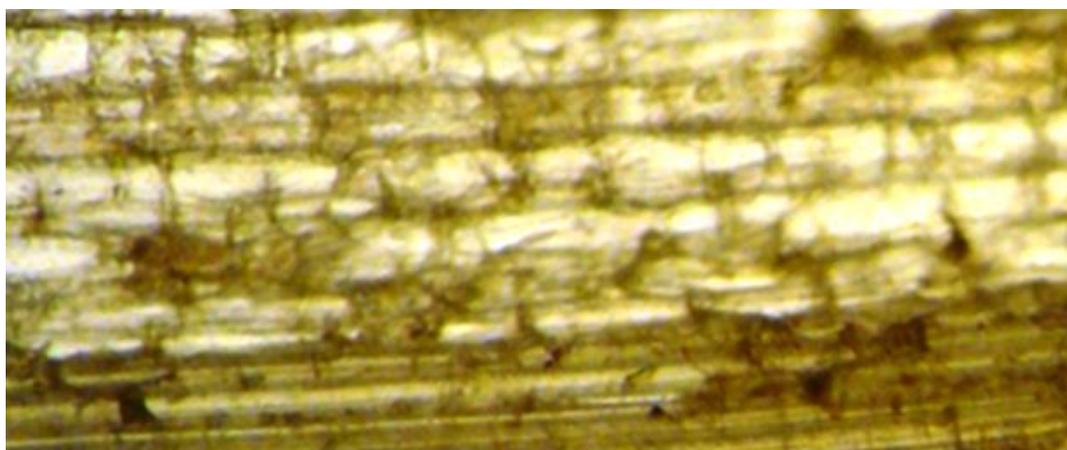


Рисунок 5 - Структура соломы пшеницы после термообработки: температура 121 °С, давление 2 атм, время 0,25 ч (увеличение ×400).

В таблице 2 представлены данные химического состава соломы зерновых после предварительной обработки.

Таблица 2 – Химический состав соломы зерновых культур (яровой мягкой пшеницы и гречихи посевной) после предварительной обработки.

Образец	Массовая доля лигнина, %	Массовая доля клетчатки, %
Солома пшеницы исходная	21,37±0,81	34,02±0,84
Солома пшеницы после термообработки при температуре $t = 100^{\circ}\text{C}$ , $p = 1,0$ атм, время $\tau = 1,5$ час	17,9±0,13	33,52±0,78
Солома пшеницы после термообработки при температуре $t = 121^{\circ}\text{C}$ , $p = 2,0$ атм, время $\tau = 0,25$ час	14,3±0,17	31,14±0,81
Солома гречихи исходная	20,51±1,01	44,95±1,28
Солома гречихи после термообработки при температуре $t = 100^{\circ}\text{C}$ , $p = 1,0$ атм, время $\tau = 1,5$ час	20,11±0,14	44,54±0,84
Солома гречихи после термообработки при температуре $t = 121^{\circ}\text{C}$ , $p = 2,0$ атм, время $\tau = 0,25$ час	19,84±0,09	42,98±0,12

Таким образом, значительное уменьшение количества лигнина и клетчатки в соломе пшеницы и гречихи, снижающих пищевую ценность сырья, наблюдается после термогидролиза при температуре  $121^{\circ}\text{C}$ , давлении  $2,0$  атм и экспозиции  $0,25$  ч. В растительном сырье наблюдается разрыв и нарушение пространственной ориентации волокон целлюлозы, что делает его более доступным для воздействия микроорганизмов и обосновывает применение последующего ферментативного гидролиза исследуемого сырья с их использованием.

В дальнейшей работе в качестве питательного субстрата для микроорганизмов с целью получения кормового белка использовали как нативную солому яровой пшеницы и гречихи, так и их гидролизаты.

### 3.3. Подбор режимов твердофазной ферментации (ТФФ) целлюлозосодержащего сырья

В настоящее время известны способы твердофазной ферментации вторичных отходов производств, осуществляемые эпифитной бактериальной и дрожжевой микробиотой, в частности представителями родов *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Chromobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Rhodotorula*,

*Debaryomeces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Schizosaccharomyces* и др.

В качестве посевного материала для твердофазной ферментации исследуемого целлюлозосодержащего сырья использовали спорово-мицелиальную суспензию микромицета *T. harzianum*. Мицелиальные грибы лучше всего приспособлены к ТФФ ввиду ряда их морфологических и физиологических свойств: относительно крупные размеры, апикальный рост, способность к неограниченному росту на едва увлажнённых субстратах при низкой активности воды, аэробность, богатый ферментный комплекс и, вследствие этого, способность расти на различных субстратах.

Основными управляемыми факторами, регулирующими рост и развитие продуцентов при твердофазной ферментации, являются температура, уровень кислотности и влагосодержание субстрата. Исходя из этого, были исследованы режимы ферментации с различными значениями вышеуказанных параметров. Эффективность режима определяли по накоплению редуцирующих сахаров в ферментолизате а также по выходу белка.

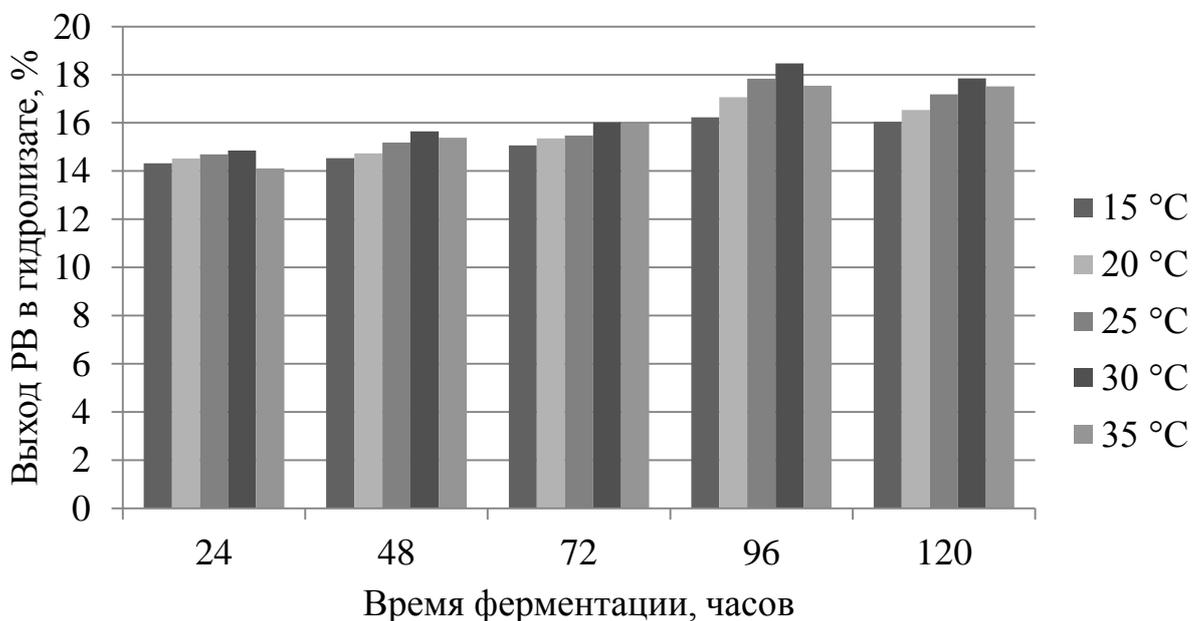


Рисунок 6 – Зависимость выхода редуцирующих веществ от времени ферментации и температуры среды.

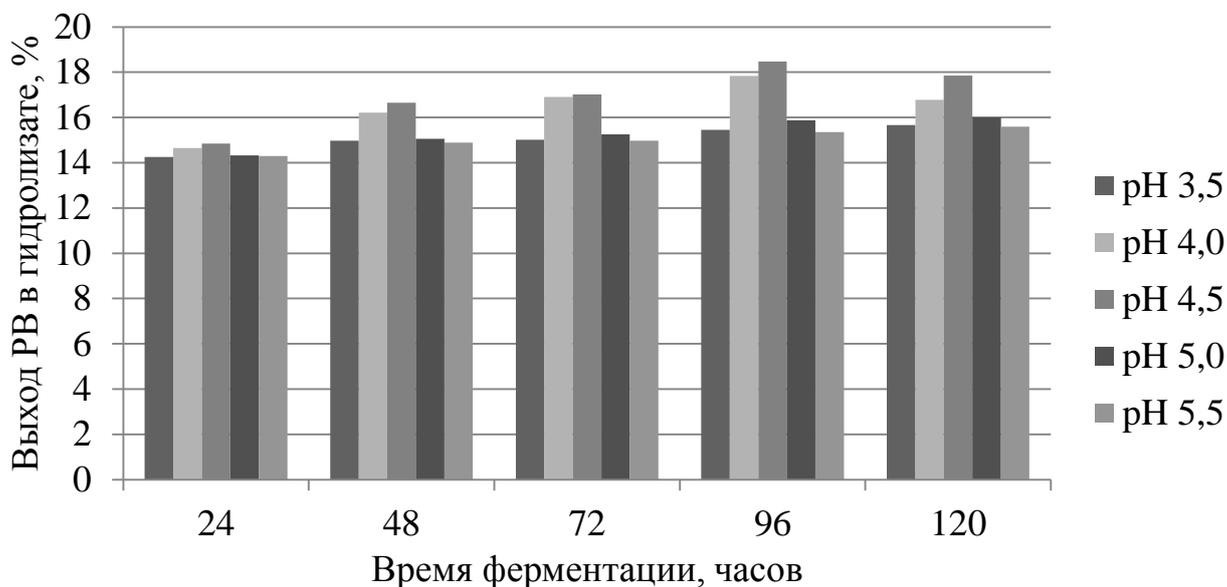


Рисунок 7 – Зависимость выхода редуцирующих веществ от времени ферментации и pH среды.

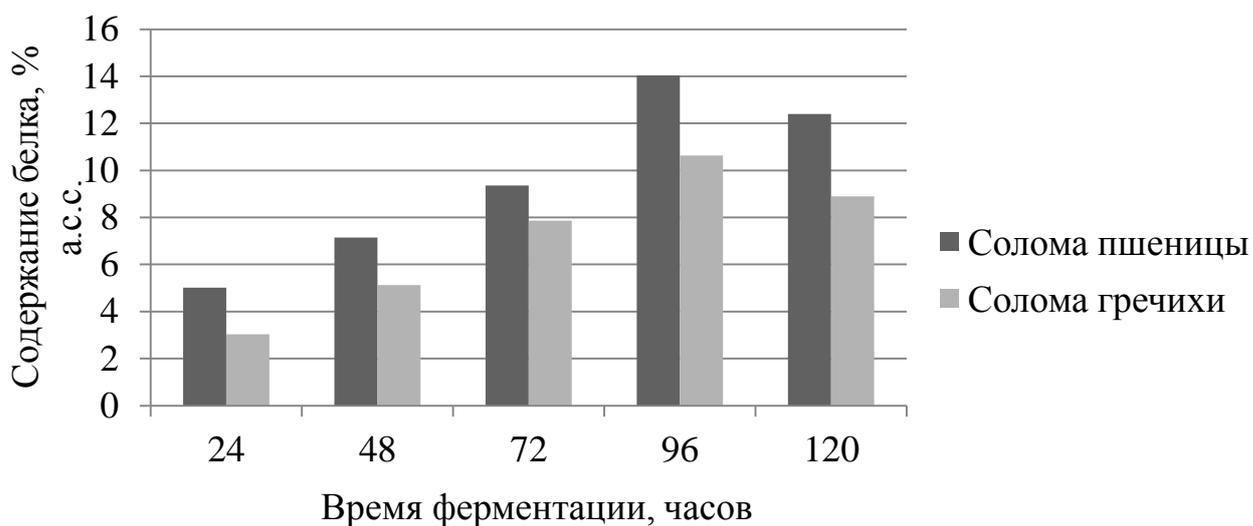


Рисунок 8 – Зависимость выхода белка от времени ферментации.

Таким образом, установлена зависимость выхода редуцирующих веществ от температуры культивирования, pH среды и времени ферментации. Максимальный выход редуцирующих веществ наблюдался спустя 96 часов ферментации при температуре 30 °C и pH 4,5 (рис. 6, 7). Максимальное содержание белка в ферментолизатах соломы пшеницы и гречихи отмечено спустя 96 ч ферментации (рис. 8). Полученные данные учитывались при дальнейшей работе с грибом *T. harzianum*.

### 3.4. Подбор режимов глубинной гетерофазной биоферментации целлюлозосодержащего сырья

Обогащение микробным протеином методом глубинной гетерофазной ферментации проводят при использовании дрожжей *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* и др. Широко известно, что грибы рода *Fusarium* являются источником белка пищевого и кормового назначения. Известен штамм гриба *Fusarium sambucinum* ВСБ-917 (ВКПМ F-169), используемый в качестве продуцента белка и физиологически активных веществ. Выбор продуцента белка *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* для биоконверсии исследуемого целлюлозосодержащего отхода методом глубинной гетерофазной ферментации обусловлен подбором нового доступного эффективного штамма для получения кормового белка.

Зависимость роста биомассы гриба *F. oxysporum* от времени ферментации pH и температуры выращивания на экспериментальном субстрате представлена на рисунках 9 и 10.

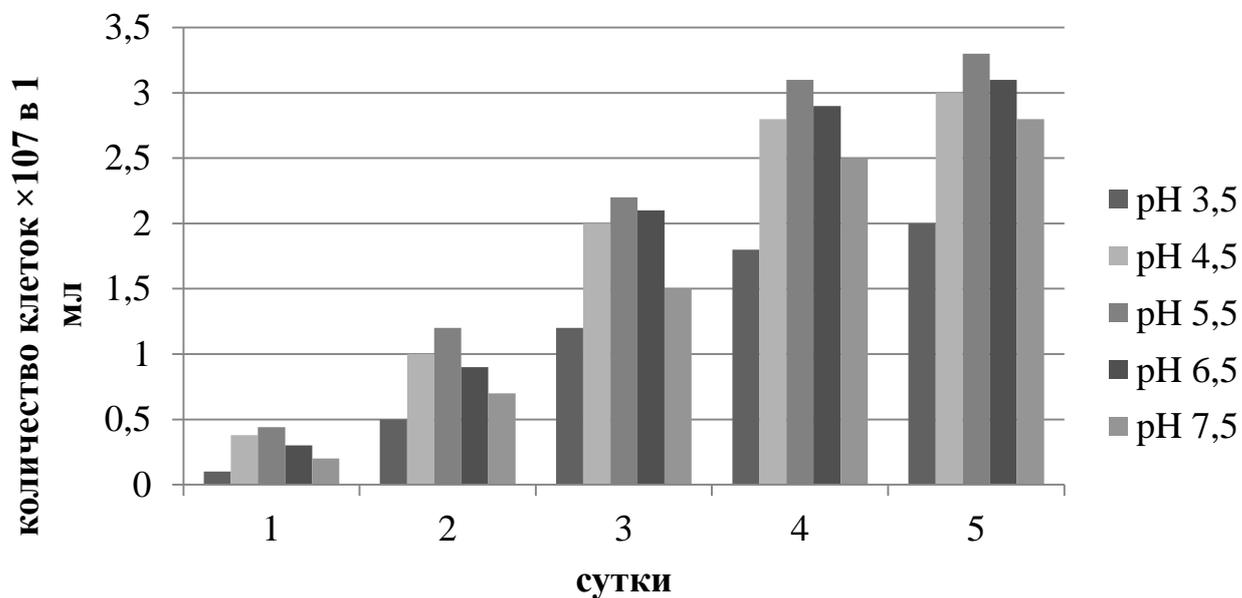


Рисунок 9 - Динамика накопления массы гриба *F. oxysporum* в зависимости от кислотности среды (прямой подсчет в камере Горяева)

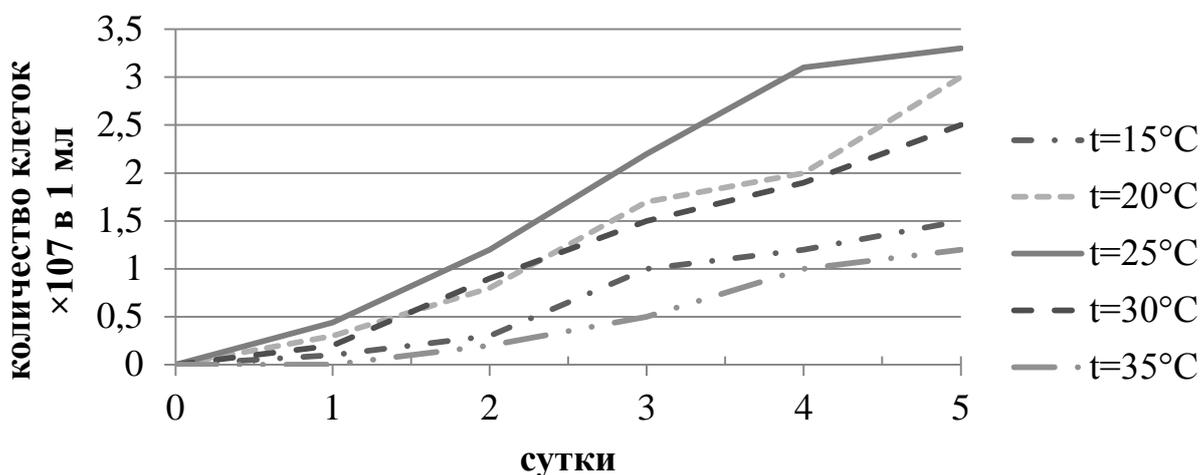


Рисунок 10 - Динамика накопления массы гриба *F. oxysporum* в зависимости от температуры выращивания (прямой подсчет в камере Горяева)

Таблица 3 – Содержание редуцирующих сахаров, протеина и клетчатки в исследуемых образцах на пятые сутки ферментации с применением гриба *F. oxysporum*

Показатели	Содержание в образцах			
	Из соломы пшеницы		Из соломы гречихи	
	В гидролизате	В полученном кормовом продукте	В гидролизате	В полученном кормовом продукте
РВ, мг/мл	14,23±0,14	17,12±0,12	12,24±0,24	14,69±0,18
Сырой протеин, а.с.в. %	4,52±0,09	16,2±0,08	2,95±0,16	8,64±0,28
Сырая клетчатка, а.с.в. %	31,14±0,84	24,12±0,42	42,98±0,32	38,28±0,64

Таким образом, установлена зависимость накопления биомассы гриба *F. oxysporum* от температуры, рН среды и времени ферментации. Максимальное накопление биомассы гриба *F. oxysporum* наблюдалось на пятые сутки культивирования при рН 5,5 (рисунок 8) и температуре 25 °С (рисунок 9). Наибольшее содержание редуцирующих веществ и сырого протеина отмечено в полученных кормовых продуктах на основе соломы зерновых культур спустя 120 часов ферментации с использованием гриба *F. oxysporum* (таблица 3). Полученные данные учитывались в экспериментах по ферментативной переработке целлюлозосодержащих отходов грибом *F. oxysporum*.

### 3.5. Микробиологическая переработка целлюлозосодержащего сырья биопрепаратом Байкал ЭМ-1

Цель исследований состояла в оценке химического состава соломы яровой мягкой пшеницы и гречихи посевной после её обработки закваской биопрепарата Байкал ЭМ-1.

Проведена оценка химического состава пшеничной и гречишной соломы после её обработки закваской биопрепарата Байкал ЭМ-1.

Препарат Байкал ЭМ-1 представляет собой устойчивую симбиотическую ассоциацию порядка 60 штаммов микроорганизмов (фотосинтезирующие бактерии, грибы р.р. *Aspergillus* и *Penicillium*, дрожжи, молочнокислые бактерии, актиномицеты)<sup>1</sup>. Штаммы способны синтезировать целлюлолитические ферменты и одноклеточный белок. Микроорганизмы биопрепарата не являются спорообразующими, согласно СанПин 23.2.1078-01 они входят в перечень веществ, не оказывающих вредного воздействия на кормовые продукты. Дата изготовления 04.2012 г.

Для эффективной деструкции углеводного комплекса целлюлозосодержащего сырья необходимы условия, в которых будет превалирующим действие целлюлолитических микроорганизмов биологического препарата. Исходя из этого, приготовление маточной закваски биопрепарата Байкал ЭМ-1 проводили при рН 5,4 - 5,5 с внесением 0,5 % раствора лактозы для активации ферментирующих грибов и ингибирования молочнокислых бактерий, способных разрушить лактозу. К субстрату, состоящему из 1 части размола (0,3 части проросших зерен ячменя и 0,7 части пшеничных отрубей) и 1 части воды нагретой до температуры 80 – 100 °С добавляли микробиологический препарат Байкал ЭМ-1 из расчета 0,08 г на 1 кг субстрата и 0,5 % раствор лактозы из расчета 100 г на 1 кг субстрата.

---

<sup>1</sup> Байкал-ЭМ. Биоудобрение для Вашего сада и огорода : сайт фирмы-распространителя [Электронный ресурс] / АРГО. – Электрон. текстовые и граф. дан. – Новосибирск, 2012. – Режим доступа : <http://baykal-em.ru>. – Заглавие с экрана.

Полученную таким образом закваску оставляли для созревания на 5 - 6 ч, а без лактозы на 10 - 12 часов при комнатной температуре.

Полученный подобным образом посевной материал использовали при засеве целлюлозосодержащего сырья. Для этого, в камеру объемом 3000 мл поместили измельченную пропаренную при температуре 100 °С солому пшеницы, увлажнили ее до содержания влаги 65 % и добавили посевной материал. Ферментацию проводили в течение 3 суток (72 ч) в анаэробных условиях при температуре 24 – 26 °С с начальным рН 5,4 - 5,5. Спустя 36 часов в конце экспоненциальной фазы роста микроорганизмов для активации биосинтеза целлюлолитических ферментов в субстрат вносили 0,5 % раствор лактозы дискретно (из расчета 100 г на 1 кг сырья). Эффективность деструкции целлюлозного комплекса соломы пшеницы оценивали по накоплению редуцирующих веществ в ферментоллизате (таблица 4).

Таблица 4 – Эффективность процесса биодеструкции целлюлозосодержащего материала (соломы пшеницы) по накоплению редуцирующих веществ

Условия микробиологической обработки	Содержание редуцирующих веществ, %					
	Время микробиологической обработки, ч					
	12	24	36	48	60	72
Без внесения раствора лактозы	2,18± 0,11	3,19± 0,05	4,23± 0,06	5,56± 0,16	7,16± 0,13	8,3±0,1 3
С внесением раствора лактозы через 36 часов ферментации	2,18± 0,11	3,19± 0,05	5,08± 0,03	6,13± 0,09	9,0±0,0 8	9,65± 0,06

Спустя 72 часа ферментации пропаренной соломы разрушилось 47,86 % полисахаридов и 72,67 % лигнина. Содержание сырого протеина составило 5,93 %, что на 1,41 % больше, чем в нативной соломе пшеницы. Содержание редуцирующих веществ с внесением раствора лактозы на 16,27 % больше, чем без внесения этого компонента. Результаты обработки пропаренной нативной соломы пшеницы представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Химический состав кормового продукта, полученного обработкой пропаренной соломы пшеницы закваской биопрепарата Байкал ЭМ-1

Показатели	Содержание, % а.с.в.	
	без внесения раствора лактозы	с внесением раствора лактозы
Целлюлоза и гемицеллюлоза	35,72±0,005	33,76±0,22
Лигнин	5,63±0,02	5,84±0,02
Сырой протеин	5,11±0,02	5,93±0,02
Редуцирующие вещества	8,3±0,13	9,65±0,06
рН	6,4±0,03	6,47±0,06

Микробиологическую обработку нативной соломы пшеницы проводили аналогично предыдущего примера, только вместо пропаривания при температуре 100 °С солому подвергали термогидролизу при рН 3,0, температура 112 °С, давление 0,5 атм, время экспозиции 25 минут. Затем рН ферментационного субстрата доводили до 5,4 - 5,5. Через 70 - 72 часа ферментации разрушилось 56,14 % полисахаридов и 78,38 % лигнина. Содержание сырого протеина составило 8,55 %, что на 4,02 % больше, чем в нативной соломе пшеницы. Содержание редуцирующих веществ с внесением лактозы на 23,54 % больше, чем без внесения этого компонента (таблица 6).

Таблица 6 – Химический состав кормового продукта, полученного обработкой гидролизованной соломы пшеницы закваской биопрепарата Байкал ЭМ-1

Показатели	Содержание, % а.с.в.	
	без внесения раствора лактозы	с внесением раствора лактозы
Целлюлоза и гемицеллюлоза	28,98±0,02	28,4±0,02
Лигнин	4,54±0,04	4,58±0,15
Сырой протеин	7,34±0,03	8,55±0,05
РВ	11,64±0,03	14,38±0,02
рН	6,45±	6,53±0,004

Микробиологическую обработку пропаренной нативной соломы гречихи посевной проводили аналогично примера с соломой пшеницы. Через 70-72 часов ферментации разрушилось 35,76% полисахаридов и 61,04% лигнина.

Содержание сырого протеина составило 5,52%, что на 2,58% больше, чем в нативной соломе гречихи. Содержание редуцирующих веществ с внесением 0,5% раствора лактозы на 36,18% больше, чем без внесения этого компонента (таблица 7).

Таблица 7 - Химический состав кормового продукта, полученного обработкой пропаренной соломы гречихи закваской биопрепарата Байкал ЭМ-1

Показатели	Содержание, % а.с.в.	
	без внесения раствора лактозы	с внесением раствора лактозы
Целлюлоза и гемицеллюлоза	37,99±0,02	37,96±0,02
Лигнин	7,97±0,01	7,99±0,06
Сырой протеин	4,97±0,02	5,52±0,03
РВ	5,86±0,05	7,98±0,01
рН	6,28±0,03	6,45±0,04

Микробиологическую обработку соломы гречихи проводили аналогично предыдущего примера, только вместо термической обработки сырья (при 100 °С), субстрат подвергали термогидролизу при рН 3,0, температуре 112°С, время экспозиции 25 минут. Затем рН ферментационного субстрата довели до рН 5,4 - 5,5. Через 70 - 72 часов ферментации разрушилось 50,13% полисахаридов и 71,62% лигнина. Содержание сырого протеина составило 8,14%, что на 5,19% больше, чем в нативной соломе гречихи. Содержание редуцирующих веществ с внесением 0,5% раствора лактозы на 40,88% больше, чем без внесения этого компонента (таблица 8).

Таблица 8 - Химический состав кормового продукта, полученного обработкой гидролизованной соломы гречихи закваской биопрепарата Байкал ЭМ-1

Показатели	Содержание, % а.с.в.	
	без внесения раствора лактозы	с внесением раствора лактозы
Целлюлоза и гемицеллюлоза	30,99±0,02	29,47±0,01
Лигнин	5,75±0,05	5,82±0,02
Сырой протеин	7,21±0,02	8,14±0,02
РВ	10,03±0,05	14,13±0,01
рН	6,26±0,02	6,3±0,03

Таким образом, обработка целлюлозосодержащего сырья (соломы пшеницы и гречихи) биопрепаратом Байкал ЭМ-1 снижает содержание полисахаридов в среднем на 50,13 – 56,14 %, лигнина на 71,62 – 78,38 %, увеличивает сырой протеин на 4,02 – 5,19 %. Биодеструкция целлюлозосодержащего сырья эффективна при использовании прогидролизованной соломы с внесением 0,5 % раствора лактозы. Содержание редуцирующих веществ в таких продуктах выше на 16,27 – 40,88 %.

Техническим результатом исследования является получение кормовых продуктов, богатых биологически активными пребиотическими, пробиотическими компонентами.

Полученные экспериментальные данные определяют основные направления переработки соломы зерновых культур микробиологическим препаратом Байкал ЭМ-1 для получения кормовых гидролизатов, а также осахаренного объемистого корма для дальнейшего применения в качестве кормового продукта в животноводстве. При этом длительность ферментации предварительно обработанного целлюлозосодержащего сырья (соломы пшеницы и гречихи) по вышеприведенным способам уменьшается до 72 часов (3 суток).

Результаты исследования послужили основой для разработки технологической схемы получения кормового продукта с использованием биопрепарата Байкал ЭМ-1 (рисунок 11).



Рисунок 11 – Технологическая схема получения кормового продукта путем переработки целлюлозосодержащего сырья с использованием биопрепарата Байкал ЭМ-1

### 3.6. Биотехнологическая переработка соломы зерновых культур (пшеницы и гречихи) грибами рода *Trichoderma harzianum* на кормовой белок

Известно, что микробицет *T. harzianum* способен синтезировать богатый комплекс целлюлолитических ферментов (эндо- $\beta$ -1,4-глюканазы (ЕС 3.2.1.4), экзо-целлобиогидролазы (ЕС 3.2.1.91), и  $\beta$ -глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21)), которые эффективно секретируются в культуральную среду и синергически осуществляют гидролиз высокомолекулярных труднорасщепляемых

растительных полисахаридов. Грибы технологичны, нетребовательны к субстрату, устойчивы к экологическому стрессу.

*Trichoderma* продуцирует внеклеточные целлюлазы и накапливает белок в процессе своего развития. Мутантные или рекомбинантные штаммы грибов рода *Trichoderma* играют ведущую роль среди промышленных продуцентов целлюлолитических ферментов, что объясняется, во-первых, их высокой секреторной способностью, а, во-вторых, разнообразием состава продуцируемого ферментного комплекса<sup>1</sup>.

Поскольку при культивировании грибов на целлюлозосодержащих субстратах целлюлолитические ферменты секретируются непосредственно в культуральную жидкость, была исследована возможность использования культуральной жидкости грибов рода *T. harzianum* в качестве препарата для ферментативного гидролиза соломы зерновых культур.

Для ферментативной обработки культуральную жидкость стандартизовали, предварительно разбавляя ее таким образом, чтобы на 1 грамм субстрата приходилось 10 единиц целлюлолитической активности. Клетки гриба от культуральной жидкости не отделяли. Режим ферментативного гидролиза следующий: суспензия субстрата (после термогидролиза) с содержанием влаги 10 %, перемешивание 120 - 150 об/мин., рН 5,0 - 5,4, температура 50 °С. Эффективность деструкции полисахаридов оценивали по накоплению редуцирующих веществ в ферментализате.

Динамика накопления редуцирующих веществ при ферментализе соломы зерновых культур культуральной жидкостью *T. harzianum* представлена на рисунке 12.

---

<sup>1</sup> Чекушина, А.В. Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов *Trichoderma*, *Penicillium* и *Muceliophthora* с увеличенной гидролитической активностью : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 03.01.04 / А.В. Чекушина ; Институт биохимии им. А.Н.Баха. – М., 2013. – 23 с.

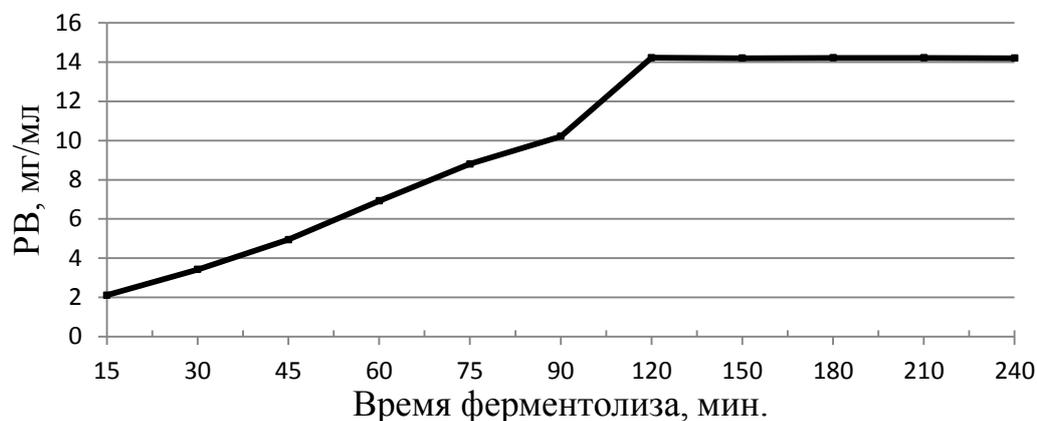


Рисунок 12 – Динамика накопления редуцирующих веществ в процессе ферментализации соломы пшеницы культуральной жидкостью гриба *T. harzianum*

Результаты исследований показали, что концентрация редуцирующих веществ в течение 120 мин инкубирования была максимальной и составила 14,23 мг/мл. При экспозиции реакционной среды свыше 120 минут ее содержание оставалось практически на постоянном уровне.

Повышение степени биоконверсии соломы зерновых культур проводили методом твердофазной ферментации спорово-мицелиальной суспензии микромицета на стерильном субстрате в лабораторном реакторе Biostat A plus объемом 3 л в стерильных условиях, 60 % по влажности субстрата при высоте слоя 60 мм, температуре 30 °С, рН 4,5 и аэрации.

Каждые 12 часов субстрат увлажняли стерильным раствором минеральных солей, отводя тем самым и продукты гидролиза, способные репрессировать активность целлюлолитических ферментов микромицета.

Культивирование проводили до начала споруляции культуры (до образования воздушного мицелия над поверхностью субстрата). Результаты биотехнологической переработки соломы зерновых культур (яровой мягкой пшеницы и гречихи посевной) представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Динамика изменения химического состава соломы зерновых культур в результате её ферментации суспензией грибов рода *T. harzianum*

Показатели биоферментации	Время биоферментации, час				
	24	48	72	96	120
Солома пшеницы					
РВ, мг/мл нач.	14,23±0,14				
РВ, мг/мл	15,20±0,09	15,96±0,04	16,12±0,08	<b>18,47±0,11</b>	18,49±0,09
сырой протеин, % а.с.с. нач.	4,52±0,09				
сырой протеин, % а.с.с.	5,02±0,12	7,14±0,05	9,36±0,07	<b>12,36±0,07</b>	12,40±0,08
сырая клетчатка, % а.с.с. нач.	34,02±0,84				
сырая клетчатка, % а.с.с.	30,92±0,12	26,12±0,13	21,06±0,09	<b>18,96±0,07</b>	18,94±0,02
Солома гречихи					
РВ, мг/мл нач.	12,24±0,06				
РВ, мг/мл	12,96±0,05	14,12±0,08	14,94±0,09	<b>15,24±0,07</b>	15,21±0,05
сырой протеин, % а.с.с. нач.	2,95±0,08				
сырой протеин, % а.с.с.	3,04±0,07	5,12±0,14	7,86±0,12	<b>9,00±0,09</b>	8,90±0,07
сырая клетчатка, % а.с.с. нач.	44,95±1,28				
сырая клетчатка, % а.с.с.	41,38±0,11	39,14±0,23	37,86±0,14	<b>32,40±0,07</b>	32,38±0,09

Через 96 часов ферментации отмечается максимальное количество редуцирующих веществ в гидролизате соломы зерновых культур и составляет 18,47 мг/мл. При этом содержание сырого протеина увеличилось в 2,7 раза, сырой клетчатки уменьшилось в 1,8 раз.

Для повышения усвояемого белка в полученном продукте исследовали возможность обогащения ферментолизата соломы зерновых культур продуктами автолиза продуцентов белка грибов рода *T. harzianum*. Для этого гетерогенную массу выдерживали в течение 23 часов при температуре 50 – 55 °С, используя в качестве индуктора автолиза 70° этиловый спирт в концентрации 1% от объема субстрата (таблица 10).

Таблица 10 - Характеристика белково-углеводных продуктов на основе соломы пшеницы и гречихи, полученных при последовательном ферментативном гидролизе и последующей твердофазной ферментации

Период	Показатели в готовом продукте, % а.с.с.			
	сырой протеин		сырая клетчатка	
	Солома пшеницы	Солома гречихи	Солома пшеницы	Солома гречихи
до автолиза	12,36±0,07	9,00±0,09	18,96±0,07	32,40±0,07
после автолиза	14,04±0,09	10,64±0,11	18,84±0,08	31,62±0,15

Полученные в результате исследований данные показывают, что при твердофазном культивировании грибов рода *T. harzianum* на ферментолизатах соломы пшеницы и при последующем автолизе этиловым спиртом содержание сырого протеина в кормовых продуктах повышалось до 14,04 %.

Методом биотестирования установлена токсикологическая безопасность полученных кормовых добавок, о чем свидетельствует интенсивное накопление численности и активности *Tetrachymena pyriformis* в течение 72 часов экспонирования образцов.

Таким образом, при использовании грибов *T. harzianum* для биоконверсии соломы зерновых культур получены белково-углеводные кормовые продукты для животноводства с содержанием сырого протеина до 14,04 %, сырой клетчатки до 18,84 % (таблица 10).

На основе полученных данных была разработана технологическая схема получения культуральной жидкости гриба *T. harzianum* на полусинтетической питательной среде (рисунок 13) и технологическая схема получения кормового продукта методом твердофазной ферментации целлюлозосодержащего сырья с использованием культуральной жидкости гриба *T. harzianum* (рисунок 14).

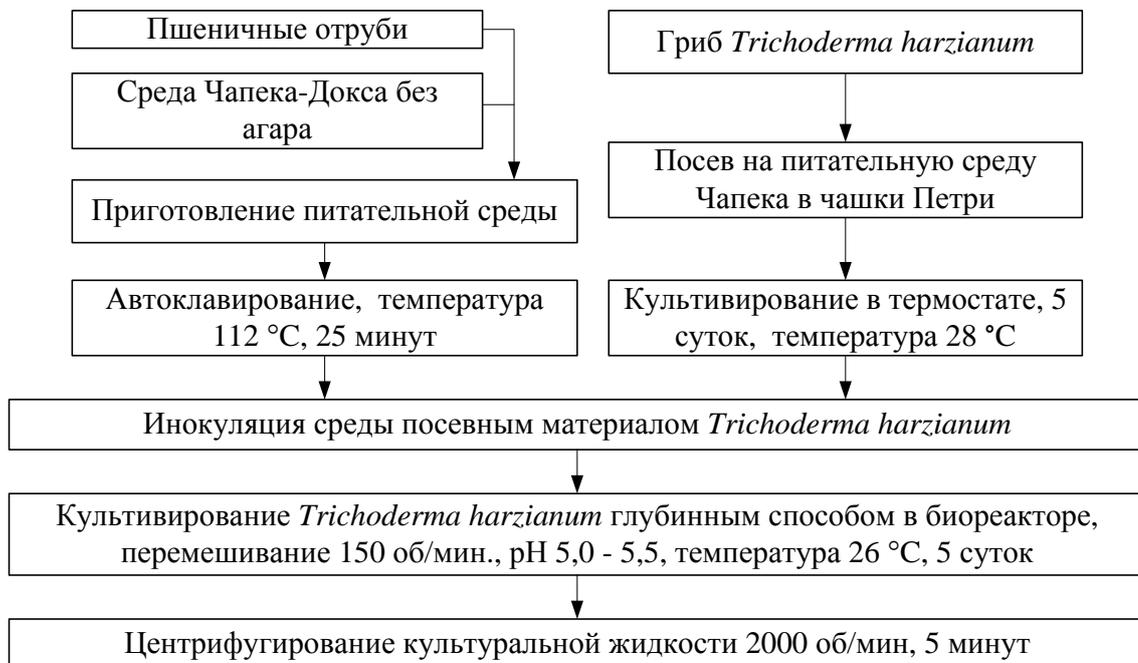


Рисунок 13 – Технологическая схема получения культуральной жидкости гриба *T. harzianum* на полусинтетической питательной среде



Рисунок 14 – Технологическая схема получения кормового продукта методом твердофазной ферментации целлюлозосодержащего сырья с использованием культуральной жидкости гриба *T. harzianum*

### 3.7. Использование гриба *Fusarium oxysporum* для глубоинной гетерофазной ферментации соломы яровой мягкой пшеницы

В качестве продуцента целлюлолитических ферментов и микопротеина был использован гриб *F. Oxysporum f. sp. pisi*, взятый из коллекции ГНУ ВНИИЗБК. Грибы рода *Fusarium* относятся к несовершенным грибам.

Несовершенный гриб *F. oxysporum* в процессе развития продуцирует целлюлолитические ферменты (эндоглюканаза, целлобиогидролаза,  $\beta$ -глюкозидаза, ксиланаза и  $\beta$ -ксилозидаза) и микопротеин. Биомасса монокультуры гриба *Fusarium* содержит низкомолекулярные олигопептидные соединения, щелочные олигопептиды, 18 аминокислот (в т.ч. незаменимые триптофан, лизин, метионин). Содержание аспарагиновой и глутаминовой аминокислот приближается к их содержанию в животных белках, также гриб содержит ненасыщенные жирные кислоты; углеводы представлены гликанами, органическими кислотами; витамины группы В (фолиевая кислота), никотиновая кислота. Минеральный состав — 22 жизненно важных микро- и макроэлемента.

Посевной материал гриба размножали на синтетической среде Чапека в чашках Петри в термостате 5 суток (рисунок 15).



Рисунок 15 – Мицелий гриба *F. oxysporum*, выращенный на синтетической среде Чапека

Глубинную гетерофазную ферментацию соломы проводили на лабораторном ферментере INFORS Minifors объемом 5 л в течение семи суток (рисунок 16). В качестве субстрата использовали полусинтетическую питательную среду, включающую в себя: среду Чапека без агара и глюкозы – 2000 мл; свекловичную мелассу (патоку) – 60 г; отруби пшеничные – 100 г; измельченную солому пшеницы яровой – 300 г.

Режим ферментации следующий: температура 26 °С, 150 оборотов в минуту, рН 5,2 – 5,9.



Рисунок 16 – Процесс получения культуральной жидкости *F. oxysporum* методом глубинной гетерофазной ферментации.

Накопление микробной биомассы в культуральной жидкости определяли методом посева на плотные питательные среды (чашечный метод Коха)<sup>1</sup>. Анализ микробиологической чистоты культур определяли с помощью светового микроскопа Olympus CX 21.

---

<sup>1</sup> Селивановская, С.Ю. Тестирование отходов, почв, материалов с использованием живых систем : учебно-методическое пособие / С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая, Р.Х. Гумерова. – Казань : Казанский университет, 2011. – 47 с.

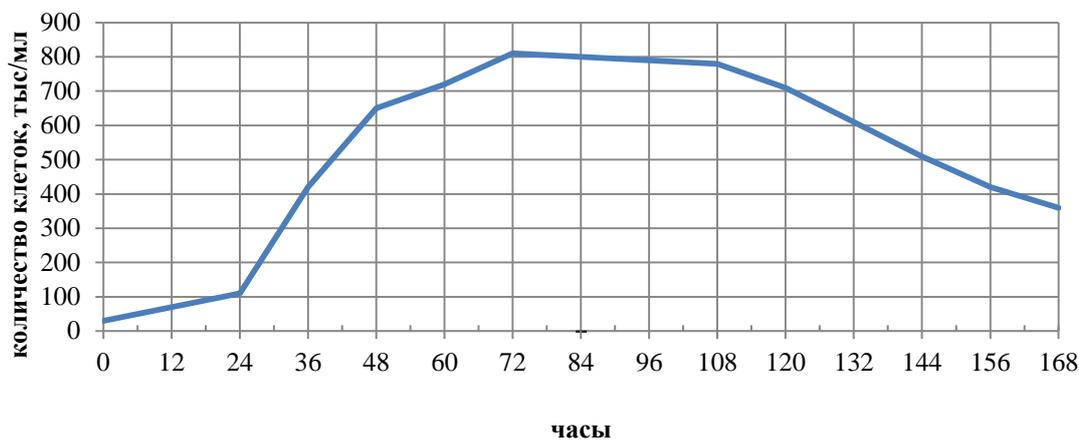


Рисунок 17 – Динамика накопления биомассы гриба *F. oxysporum* в культуральной жидкости

На рисунке 17 ясно различимы фазы роста гриба: адаптации (0 - 24 ч), логарифмической фазы (от 24 до 48 ч), фазы затухающего роста (48 - 72 ч), стационарной (72 - 108 ч), фазы отмирания (108 - 168 ч), что представляет собой типичную кривую роста продуцентов.

По окончании культивирования жидкость отфильтровывали и исследовали состав полученного осадка, содержащего ферментированные солому и отруби, а также автолизат биомассы микромицета *F. Oxysporum* (рисунок 18). Следует отметить, что биомасса гриба *Fusarium* содержит низкомолекулярные олигопептидные соединения, щелочные олигопептиды, 18 аминокислот (в т.ч. незаменимые триптофан, лизин, метионин).



Рисунок 18 – Полученный в результате ферментативного гидролиза соломы пшеницы культуральной жидкостью *F. oxysporum* сырой продукт

В полученном продукте определяли содержание редуцирующих веществ, сырого протеина и клетчатки (таблица 11).

Таблица 11 – Биохимические показатели нативной соломы яровой мягкой пшеницы и кормового продукта

Показатели	Нативная солома пшеницы	Полученный кормовой продукт
РВ, мг/г	14,23±0,14	16,45±0,16
Сырой протеин, % а.с.в.	4,52±0,09	22,2±0,12
Сырая клетчатка, % а.с.в.	34,02±0,84	28,05±1,04

В результате глубинного культивирования гриба *F. oxysporum* на полусинтетической питательной среде количество редуцирующих веществ в готовом продукте увеличилось незначительно, что говорит о слабой степени ферментативного гидролиза клетчатки. Это подтверждается экспериментально – содержание целлюлозы снизилось с 34,02 до 28,05 %. Содержание белка в готовом продукте увеличилось в 4,9 раз по сравнению с нативной соломой пшеницы вследствие накопления биомассы гриба.

Содержание белка в готовом продукте, обогащенном биомассой гриба *F. Oxysporum*, увеличилось в 4,9 раз по сравнению с нативной соломой пшеницы.

Известно, что различные виды грибов рода *Fusarium* в процессе жизнедеятельности способны синтезировать микотоксины: боверицин, монилиформины и фумонизины, являющиеся токсичными для млекопитающих (табл. 12). Есть данные, что количество микотоксинов зависит от условий культивирования и может быть существенно снижено при определённых условиях. Отмечается также, что термическая обработка также инактивирует эти метаболиты. В связи с этим полученный продукт высушивали в сухожаровом шкафу при температуре 180 °С в течение 20 минут, так как по литературным данным подобная термообработка снижает уровень содержания боверицина на 80 % от исходного<sup>1</sup>. Деградиацию боверицина также вызывают ферменты, продуцируемые штаммами дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* LO9, YE5, A34, и A17<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Месаа, G. Beauvericin degradation during bread and beer making / G. Месаа, Т. Zhou, X.-Z. Lib [and others] // Food Control. – 2013. - № 1 (34). – p. 1 – 8.

<sup>2</sup> Degradation of the minor Fusarium mycotoxin beauvericin by intracellular enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* / G. Месаа, А. Ritienib, Т. Zhou, [and other] // Food Control. – 2013. – vol. 33, issue 2. – p. 352 – 358.

Таблица 12 - Основные микотоксины, продуцируемые грибами рода *Fusarium*<sup>1</sup>

Вид гриба	Трихотеценовые микотоксины				Зеараленон (ЗЕН)	Фумонизины (ФУМ)	Монилиформин (МОН)
	Дезоксиниваленол (ДОН)	Т-2/НТ-2 токсины	Ниваленол (НИВ)	Диацетоксисцирпенол (ДАС)			
<i>F. graminearum</i>	+++		+		+++		
<i>F. culmorum</i>	++		+		++		
<i>F. sporotrichioides</i>		+++		+	+		
<i>F. langsethiae</i>		+++		++			
<i>F. poae</i>			+++	++			
<i>F. cerealis</i>			++		+		
<i>F. avenaceum</i>							+++
<i>F. tricinctum</i>							+++
<i>F. equiseti</i>		+		++	+		
<i>F. verticillioides</i>						+++	+
<i>F. proliferatum</i>						++	++
<i>F. subglutinans</i>					+	+	++
<i>F. oxysporum</i>						+	+

На основе полученных результатов эксперимента была разработана технологическая схемы получения кормового продукта методом глубинной гетерофазной ферментации целлюлозосодержащего сырья с использованием гриба *F. oxysporum* (рисунок 19).

<sup>1</sup> Гагкаева, Т.Ю. Ячмень, грибы, микотоксины, пиво / Т.Ю. Гагкаева / Материалы IV Международной конференции «Материально-техническая и сырьевая база для солодовенного и пивоваренного производств», 6 – 7 сентября 2012 года. – 26 с.



Рисунок 19 – Технологическая схема получения кормового продукта с использованием гриба *F. oxysporum*

### 3.8. Испытание на токсичность полученных кормовых продуктов

Токсикологическая безопасность кормового продукта, полученного с использованием гриба *F. oxysporum*, была исследована на лабораторных мышах CD-1, взятых из вивария ФГБОУ ВПО «ОрёлГАУ». Для оценки токсичности было сформировано 2 группы (опытная и контрольная) по 10 мышей в каждой группе (рисунок 20). 10 % основного рациона опытной группы заменили полученным экспериментальным продуктом. Эксперимент проводили в течение 14 дней. Питьё не ограничивали. Исследования показали, что у мышей опытной и контрольной групп на протяжении всего периода наблюдения не было

внешних признаков интоксикации. Кроме того, не регистрировались отклонения от нормы поведения в общем состоянии и аппетите. Животные были подвижными и активными, хорошо поедали корм, сохраняя все рефлексы.



Рисунок 20 – Лабораторные мыши CD-1, взятые для исследования на токсичность из коллекции вивария ФГБОУ ВПО «ОрёлГАУ»

**Картина вскрытия мышей.** Все животные были забиты с соблюдением принципов эвтаназии. По истечении 14 дней проводилось вскрытие подопытных животных. После забоя оценивался внешний вид органов, кровенаполнение (рисунок 21). Забор крови для биохимических исследований производили путем полного обескровливания животных (декапитация).



а)

б)

в)

Рисунок 21 – а) мышь после вскрытия; б) внутренние органы контрольной мыши; в) внутренние органы опытной мыши

В результате вскрытия подопытных животных макроскопических изменений со стороны внутренних органов отмечено не было. Патологии со стороны легких и сердца нет. Печень без видимых изменений. Желчный пузырь не растянут, содержимое желчного пузыря желтого цвета. Слизистая оболочка желудка без изъязвлений и гиперемии.

Таблица 13 - Содержание билирубина и общего белка в крови мышей

№ п/п	Показатели	Ед. измер.	Группы	
			Контрольная (n=10)	Опытная (n=10)
1.	Содержание общего белка	г/л	61,8±0,95	64,2±1,02
2.	Содержание билирубина	мкмоль/л	7,98±0,15	7,79±0,08

Разница между средними значениями содержания общего белка в крови мышей опытной и контрольной групп в конце опыта была равна 2,4 г/л (в опытной группе содержание общего белка в крови мышей увеличилось на 3,9%), но она недостоверна.

Содержание билирубина в крови мышей опытной группы было ниже по сравнению с контролем на 0,19 мкмоль/л (2,4%). Разница между средними значениями содержания билирубина в крови мышей опытной и контрольной групп недостоверна, но следует отметить, что в опытной группе наблюдается тенденция к его снижению (таблица 13).

Таблица 14 – Живая масса мышей контрольной и опытной групп до и после опыта (через 14 дней), г

№ п/п	Группы	Средняя живая масса одной головы до начала опыта (n=10 гол.)	Живая масса одной головы после проведения опыта (n=10 гол.)
1.	Контрольная	34,6±1,23	34,2±1,42
2.	Опытная	32,6±1,16	36,0±0,88*

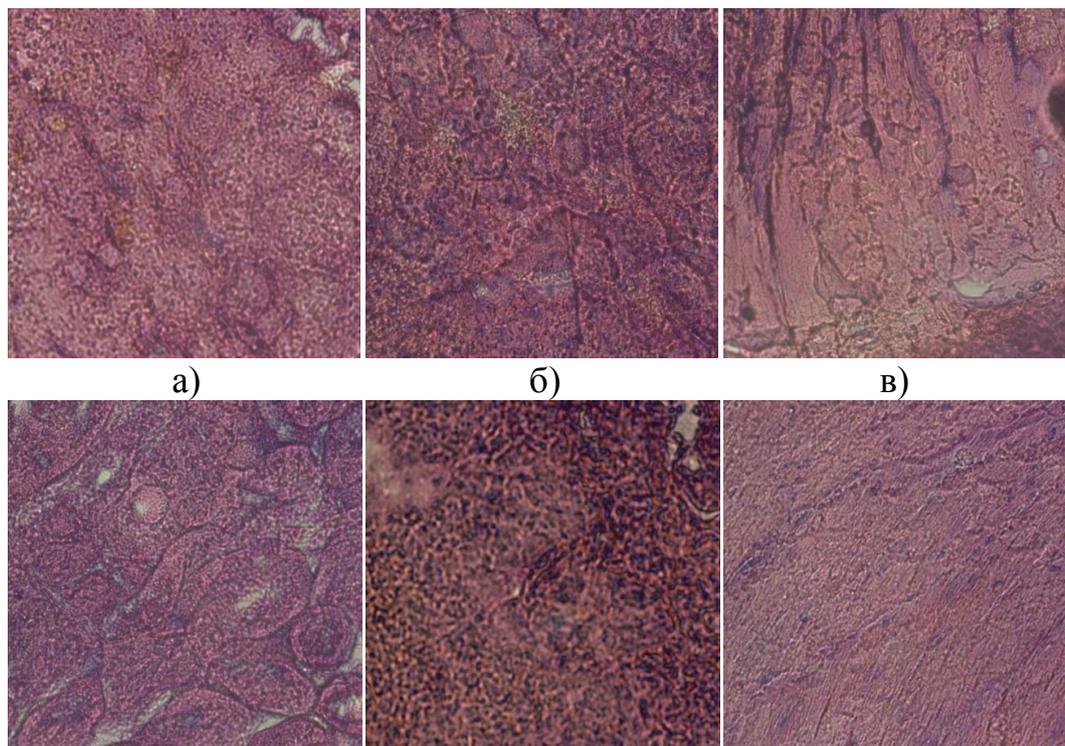
При: \*— $p \leq 0.05$ ; \*\*— $p \leq 0.01$

Средняя живая масса мышей контрольной группы перед проведением эксперимента составила 34,6 г, после проведения эксперимента – 34,2 г, то есть она незначительно уменьшилась (1,2 %). Разница недостоверна. В опытной группе средняя живая масса мышей в начале опыта составила 32,6 г, в конце опыта она достоверно увеличилась на 10,4 % и составила 36,0 г (таблица 14).

Гистологическое исследование печени, сердца и почек выявило внутриклеточную белковую дистрофию паренхиматозных органов, что может

свидетельствовать о слишком большой дозировке исследуемой добавки (рисунок 22).

#### Контрольная группа



#### Опытная группа

Рисунок 22 – Гистологическое исследование внутренних органов мышей: а) почка; б) печень; в) сердце

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что замена 10% массы корма для мышей на кормовой продукт, полученный при обработке пшеничной соломы микроорганизмами *Fusarium oxysporum*, позволила достоверно увеличить живую массу мышей на 10,4%. Кормовая добавка не вызвала выраженного токсикоза, на основании чего ее можно считать малотоксичной.

### 3.9. Испытание полученных кормовых продуктов в бройлерном птицеводстве

При проведении экспериментальных исследований по определению влияния кормовых добавок, полученных с использованием микробиологического препарата Байкал ЭМ-1, грибов *T. harzianum* и *F. oxysporum* на продуктивность и сохранность цыплят-бройлеров мы

сформировали три опытные группы и одну контрольную. В каждой группе было по 30 голов цыплят-бройлеров, всего задействовано – 120 голов. Контрольную группу цыплят кормили основными рецептами комбикормов, применяемых в хозяйстве (приложение 1). Рецепты комбикормов опытных групп цыплят-бройлеров включали, те же компоненты кормов, однако после двухнедельного возраста и до конца выращивания, 10% зернового корма (пшеница) было заменено на вновь полученные кормовые добавки: К.Д.<sub>1</sub> (солома пшен.+Т) – кормовая добавка на основе соломы пшеницы с использованием гриба *T. harzianum*; К.Д.<sub>2</sub> (солома пшен.+БЭМ-1) – кормовая добавка на основе соломы пшеницы и использованием закваски биопрепарата Байкал ЭМ-1; К.Д.<sub>3</sub> (солома пшен.+F) – кормовая добавка на основе соломы пшеницы с использованием гриба *F. oxysporum*.

Для опыта были использованы цыплята-бройлеры кросса «Конкурент-2». Технология выращивания цыплят-бройлеров (содержание, параметры микроклимата, режимы освещения и мощность освещения) была одинаковой для всех групп. В хозяйстве применяют для выращивания бройлеров клеточные батареи типа КБУ-3 (универсальные, трехъярусные). Первоначальное целевое назначение – выращивание ремонтного молодняка яичного направления, но успешно используется и для выращивания цыплят-бройлеров. Размеры клеток (мм): длина 900, глубина (ширина) 455, высота 410, площадь пола 3690 см<sup>2</sup>. Удобна для наблюдения за состоянием птицы и ее отлова. Клетки этой батареи также наиболее удобны при методе индивидуальных ветеринарных обработок. В каждой клетке размещали по 10 голов цыплят-бройлеров.

В течение всего периода выращивания наблюдали за ростом и сохранностью цыплят подопытных групп. Цыплят-бройлеров взвешивали в суточном возрасте и при убойе. В возрасте 42 дней цыплят-бройлеров направляли на убой.

В таблице 15 показано среднее количество скармливаемого комбикорма в сутки на одну голову в каждую неделю выращивания и количество добавляемых кормовых добавок.

Таблица 15 – Нормы скармливания цыплятам-бройлерам комбикорма и кормовых добавок.

Группы	Возраст цыплят-бройлеров, недель						Скармлено за весь период выращивания на одну голову, г	
	1	2	3	4	5	6	комбикорма и добавок	всего корма
Контрольная (комбикорм)	40	85	105	120	130	140	4340	4340
1-я опытная Комбикорм	40	85	98	112	121	130	4102	4340
К.Д. <sub>1</sub> (солома пшен.+Т)	-	-	7	8	9	10	238	
2-я опытная Комбикорм	40	85	98	112	121	130	4102	4340
К.Д. <sub>2</sub> (солома пшен.+БЭМ-1)	-	-	7	8	9	10	238	
3-я опытная Комбикорм	40	85	98	112	121	130	4102	4340
К.Д. <sub>3</sub> (солома пшен.+F)	-	-	7	8	9	10	238	

В результате проведенных исследований на цыплятах-бройлерах было установлено, что замена в комбикорме 10% пшеницы на полученные нами кормовые добавки: К.Д.<sub>1</sub> (солома пшен.+Т); К.Д.<sub>2</sub> (солома пшен.+БЭМ-1); К.Д.<sub>3</sub> (солома пшен.+F) не оказало отрицательного влияния на рост и сохранность цыплят (таблица 14). Живая масса одной головы в начале выращивания была в пределах 41,0 г – 41,3 г. В конце выращивания живая масса цыплят-бройлеров всех групп имела незначительные различия. Самой высокой живая масса в 42-х дневном возрасте была у цыплят-бройлеров третьей опытной группы, получавшей кормовую добавку из соломы пшеницы, обработанной грибами *Fusarium oxysporum*. Данный показатель имел значение – 2031,4 г, что выше по сравнению с живой массой в контрольной, 1-й и 2-й опытными группами на 1,38%, 1,97% и 3,7% соответственно. Разница между группами по данному показателю недостоверна. Среднесуточный прирост за весь период

выращивания находился в пределах 47,2 г (2-я опытная группа) – 47,4 г (3-я опытная группа), в контрольной и 1-й опытной группах – 47,3 г.

Таблица 16 – Показатели интенсивности роста и сохранности цыплят-бройлеров.

Показатели	Группы			
	Контрольная (комбикорм)	1 опытная (комбикорм+ К.Д. <sub>1</sub> )	2 опытная (комбикорм+ К.Д. <sub>2</sub> )	3 опытная (комбикорм + К.Д. <sub>3</sub> )
Количество голов в начале опыта	30	30	30	30
Количество голов в конце опыта	28	29	30	28
Живая масса одной головы в начале опыта, г	41,2±0,09	41,1±0,10	41,3±0,08	41,0±0,11
Живая масса одной головы в конец опыта (42 дня), г	2028,6±8,40	2027,4±7,20	2023,9±11,34	2031,4±7,90
Абсолютный прирост одной головы, г	1987,4±8,65	1986,3±7,11	1982,6±9,74	1990,4±7,87
Среднесуточ-ный прирост, г	47,3±0,19	47,3±0,16	47,2±0,18	47,4±0,15
Сохранность, %	93	97	100	93

Скармливание кормовых добавок цыплятам-бройлерам в течение 42 дней положительно сказалось на их сохранности (таблица 16). Наивысшей она была во второй опытной группе (100%), где цыплятам давали кормовую добавку, полученную после обработки соломы пшеницы биологическим препаратом Байкал ЭМ-1. В первой опытной группе сохранность цыплят-бройлеров также была выше по сравнению с контрольной и третьей опытной группами на 4% и составила 97%. В третьей опытной группе сохранность цыплят была на уровне контрольной группы и составила 93%.

Замена в комбикорме 10% зерна пшеницы на полученные кормовые добавки при кормлении цыплят-бройлеров, начиная с 2-х недельного возраста, позволило снизить расход комбикорма на одну голову за весь период

выращивания на 238 г (таблица 17). В связи с этим, расход комбикорма на 1 кг прироста цыплят-бройлеров в опытных группах был ниже по сравнению с контрольной группой на 5,3% в 1-й и 2-й опытных группах и 5,8% в 3-й опытной группе соответственно.

Таблица 17 – Расход кормов на 1 кг прироста цыплят-бройлеров без учета кормовой добавки.

Группы	Расход комбикорма за весь период выращивания на 1 голову, г	Расход комбикорма на голову в сутки, г	Абсолютный прирост 1 головы за весь период выращивания, г	Расход комбикорма на 1 кг прироста, кг
Контрольная	4340	103,3	1987,4±8,65	2,18
1-я опытная	4102	97,7	1986,3±7,11	2,07
2-я опытная	4102	97,7	1982,6±9,74	2,07
3-я опытная	4102	97,7	1990,4±7,87	2,06

Таким образом, замена в комбикорме для цыплят-бройлеров 10 % пшеницы на полученные нами кормовые добавки позволило:

- сохранить интенсивность роста цыплят-бройлеров в опытных группах на уровне контроля, а в третьей опытной группе при применении кормовой добавки (солома пшеницы + *F.oxysporum*), увеличить ее по сравнению с контролем на 1,5%;

- повысить сохранность цыплят-бройлеров на 7% при применении кормовой добавки (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1) и на 4% при применении кормовой добавки (солома пшеницы + *T. harzianum*);

- снизить расход комбикорма на 1 кг прироста цыплят-бройлеров в опытных группах по сравнению с контрольной группой на 5,3 - 5,8%.

### **3.10. Прогноз экономической эффективности предложенной технологии переработки соломы на полезные продукты**

В настоящее время в птицеводческой промышленности как никогда, актуальна замена дорогостоящего сырья, включаемого в состав комбикорма, а именно зерновых кормов и кормов животного происхождения, применяемых в

кормлении птицы на нетрадиционные кормовые средства, позволяющих уменьшить долю зерновых компонентов, а, следовательно, снизить себестоимость продукции птицеводства.

Проблема производства и использования нетрадиционных видов сырья, получаемых из малоиспользуемых или вообще неиспользуемых отходов сельского хозяйства, растениеводства, животноводства, зерноперерабатывающих и др. производств возникла не так давно. Этому способствовали, с одной стороны, рост промышленности, а с другой - интенсификация птицеводства и резкое увеличение потребности в белковых составляющих комбикормов, а также экологические проблемы (Красильников, 2011).

В производстве и применении кормовых добавок основными показателями экономической эффективности являются производительность труда, себестоимость, рентабельность производства и прибыль, полученная от реализации продукции. Результаты выполненных расчетов по экономической эффективности применения полученной кормовой добавки К.Д.<sub>2</sub> (солома пшен.+БЭМ-1) –представлена в таблице 18.

Расчеты показали, что себестоимость 1 кг кормовой добавки К.Д.<sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1), полученной обработкой соломы яровой мягкой пшеницы препаратом Байкал ЭМ-1 составила 5 руб. 49 коп., что ниже стоимости фуражного зерна, применяемого в комбикорме для цыплят-бройлеров, на 4 руб. 01 коп.

Таблица 18 - Экономическая эффективность производства и применения кормовой добавки К.Д.<sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1)

Показатель	Числовое значение
<i>Расчет себестоимости производства 1 кг кормовой добавки К.Д.<sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1)</i>	
Стоимость Байкал ЭМ-1 объем 80 мл, руб.	886
Затраты на хранение и транспортировку 1 т соломы, руб.	990
Стоимость 100 кг отрубей для приготовления закваски, руб.	450
Стоимость лактозы, используемой на 1 т соломы, руб.	42
Энергопотребление сушилки РС-1,0 (сушка: опилок, соломы) (производительность 1т в час) 25 кВт/ч 7руб. кВт., руб.	175
Энергопотребление измельчителя соломы ис-850 на 1т, руб.	192,50
Заработная плата с начислениями за период производства добавки, руб.	2000,00
Амортизация (нормативный срок – 10 лет)	492
Прочие затраты (5 % от суммы прямых затрат), руб.	261,38
Итого затрат, руб.	5488,88
Себестоимость 1 кг кормовой добавки К.Д. <sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1), руб.	5,49
<i>Уровень рентабельности и прибыль, полученная от использования кормовой добавки К.Д.<sub>2</sub></i>	
Стоимость фуражного зерна, руб.	9,50
Уровень рентабельности производства кормовой добавки К.Д. <sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1), %	73,04
Экономия фуражной пшеницы (период выращивания 42 дня) при замене 10% ее на кормовую добавку К.Д. <sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1) в комбикорме для цыплят-бройлеров, в расчете на 1000 голов, кг.	238
Экономический эффект от использования кормовой добавки К.Д. <sub>2</sub> с учетом 100% сохранности поголовья, руб.	1021,19

Уровень рентабельности производства кормовой добавки К.Д.<sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1) составил 73,04%.

Расчет экономической эффективности показал, что при кормлении цыплят-бройлеров, замена 10% фуражной пшеницы в комбикорме на кормовую добавку К.Д.<sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1) в течение 28-ми дней позволило снизить расход фуражной пшеницы на одну голову на 238 г.

Экономический эффект от использования кормовой добавки К.Д.<sub>2</sub> составил 1021,19 руб. на 1000 голов цыплят-бройлеров. Данный показатель рассчитан с учетом разницы в стоимости фуражного зерна и кормовой добавки (4,01 руб.), а также с учетом 100% сохранности поголовья при применении кормовой добавки К.Д.<sub>2</sub>, полученной путем ферментативного гидролиза соломы яровой мягкой пшеницы с использованием микробиологического препарата Байкал ЭМ-1.

Таким образом, полученные в работе результаты исследований и расчет экономической эффективности производства и применения кормовой добавки К.Д.<sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1) позволяют рекомендовать замену в комбикорме для цыплят-бройлеров 10% фуражной пшеницы на данную кормовую добавку.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Обоснована возможность использования соломы зерновых культур в качестве сырья для получения кормового белка с применением микробиологического препарата Байкал ЭМ-1 и грибов *T. Harzianum*, *F. oxysporum*. Оптимальными параметрами предобработки измельченной до 2 мм соломы яровой пшеницы и гречихи, обеспечивающими разрушение лигнин-целлюлозного комплекса и способствующими последующему ферментативному гидролизу исследуемого сырья с использованием микроорганизмов, являются температура 121 °С, давление 2,0 атм и время термогидролиза 0,25 часа.

2. Максимальный выход редуцирующих веществ, являющихся основным показателем эффективности процесса деструкции целлюлозного комплекса соломы пшеницы и гречихи, наблюдался при твердофазной ферментации споро-мицелиальной суспензией гриба *T. harzianum* через 96 часов ферментации при температуре 30 °С и рН 4,5. При указанных условиях отмечено максимальное содержание белка в ферментолизатах. Разработка режимов глубинной гетерофазной биоферментации показала, что на десятые сутки культивирования накопление массы гриба *F. oxysporum* достигало максимального значения при рН 5,5 и температуре среды 25 °С, что позволило считать данные параметры оптимальными.

3. Установлено, что при использовании грибов рода *T. harzianum* в биоконверсии соломы пшеницы и гречихи возможно получение белково-углеводных кормовых продуктов для животноводства с содержанием сырого протеина до 14,04 %, сырой клетчатки до 18,84 %; микромицет *F. oxysporum* может быть использован для получения белковой кормовой добавки с содержанием сырого протеина до 22,2 % а.с.в. Биопрепарат Байкал ЭМ-1 снижает содержание полисахаридов в соломе в среднем на 52 %, лигнина на 75,53 %, увеличивает сырой протеин на 2,71 %.

4. Замена 10 % массы корма для мышей на кормовой белок, полученный при обработке пшеничной соломы микроорганизмами *F.*

*oxysporum*, позволила достоверно увеличить живую массу мышей на 10,4 %. Кормовая добавка не вызывала выраженного токсикоза и не оказывала отрицательного влияния на гомеостаз организма мышей, на основании чего ее можно считать малотоксичной.

5. Разработаны технологические схемы комплексной переработки соломы зерновых культур в кормовой белок; рассчитана предварительная экономическая эффективность предложенной биотехнологии переработки соломы на полезные кормовые продукты. Проведена промышленная апробация в условиях ЗАО «Березки».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авраменко, П.С. Содержание обменной энергии в химически консервированном силосе / П.С. Авраменко, Л.М. Постовалова, Г.В. Шамрицкая // Научные основы развития животноводства в БССР : Межведомственный сборник / Белорусский научно-исследовательский институт животноводства. – Минск, 1988. – Т. 18. – С. 78 – 83.

2. Алексеев, Г.В. Переработка нетрадиционного растительного сырья с целью дальнейшего его использования в продуктах питания / Г.В. Алексеев, В.А. Головацкий, И.В. Краснов [и др.] // Электронный научный журнал процессы и аппараты пищевых производств [Электронный ресурс] / СПб НИУ ИТМО ИХиБТ. – Электрон. текстовые дан. – С-Петербург : СПбГУНиПТ, 2007. – Режим доступа : <http://processes.open-mechanics.com/articles/29.pdf>. - Заглавие с экрана.

3. Алимova, Ф.К. Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф.К. Алимova, Д.И. Тазетдинова, Р.И. Тухбатова // Учебно-методическое пособие. - Казань: УНИПРЕСС ДАС, 2007. – 234 с.

4. Алимova, Ф.К. Использование *Trichoderma* в процессе переработки отходов спиртового производства / Ф.К. Алимova, Е.В. Скворцов, Т.А. Мельникова [и др.] // Вестник биотехнологии. – 2007. - № 3. – С. 22 – 26.

5. Алимova, Ф.К. Методы определения гидролаз почв и почвенных микроорганизмов: Учебно-методическое пособие / Ф.К. Алимova, Р.И. Тухбатова, Д.И. Тазетдинова. – Казань : Казанский университет, 2010. – 67 с.

6. Алимova, Ф.К. Современная система *trichoderma/hypocrea* / Ф.К. Алимova // Ученые записки Казанского университета. Серия: естественные науки. – 2005. – Т. 147, № 2. – С. 28 – 57.

7. Анализ рынка кормового белка в России в 2007 - 2011 гг, прогноз на 2012-2016 гг : демонстрационная версия отчета / BusinesStat // РБК - Исследования рынка, готовые маркетинговые исследования и на заказ, маркетинговый план, бизнес-планы [Электронный ресурс] / РосБизнесКонсалтинг. – Электрон. текстовые и граф. дан. – М., 2012. – Режим

доступа : <http://marketing.rbc.ru/research/562949983244233.shtml>. - Заглавие с экрана.

8. Базунова, М.В. Способы утилизации отходов полимеров / М.В. Базунова, Ю.А. Прочухан // Вестник башкирского университета. – 2008. – Т. 13, № 4. – С. 875 – 885.

9. Байкал-ЭМ. Биодобрение для Вашего сада и огорода [Электронный ресурс] : сайт фирмы-распространителя / АРГО. – Электрон. текстовые и граф. дан. – Новосибирск, 2012. – Режим доступа : <http://baykal-em.ru>. – Заглавие с экрана.

10. Бекер, М.Е. Использование микробной биотехнологии в кормопроизводстве и утилизации отходов / М.Е. Бекер. – Биотехнология. – 1985. - № 6 – С. 14 – 24.

11. Беловежец, Л.А. Перспективные способы переработки вторичного лигноцеллюлозного сырья / Л.А. Беловежец, И.В. Волчатова, С.А. Медведева // Химия растительного сырья. – 2010. - № 2. – С. 5 – 16.

12. Биотехнологическая переработка отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности / М.М. Шамцян, Б.С. Колесников, А.А. Клепиков [и др.] // Российский химический журнал. – 2011. – Т. LV, № 1. – С. 17 – 25.

13. Бирюков, В.В. Основы промышленной биотехнологии / В.В. Бирюков. - М. : КолосС, 2004. – 296 с.

14. Бойко, И.И. Использование ферментных препаратов и грибных культур для улучшения силосуемости и повышения питательной ценности трудносилосующихся и несилосующихся растений : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / И.И. Бойко ; Дубровицы. – М., 1998 – 24 с.

15. Болобова, А.В. Поиск грибных продуцентов алкалостабильных и термостабильных целлюлаз / А.В. Болобова, А.В. Кураков // Прикл. биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35, № 4. – С. 402 – 408.

16. Бондарев, В.А. Приемы повышения качества кормов / В.А. Бондарев // Кормопроизводство. – 2003. - № 1. – С. 33 – 36.

17. Борисенков, М.Ф. Действие ферментов на солому злаков / М.Ф. Борисенков, А.А. Шубаков, Л.С. Кочева [и др.] // Химия растительного сырья. – 2011. - № 4. – С. 19 – 23.
18. Брызгалов, Л.П. Производство кормовых дрожжей / Л.П. Брызгалов, А.А. Андреев. - М. : Лесная промышленность, 1965. – 278 с.
19. Бутова, С.Н. Биотехнологическая деградация отходов растительного сырья / С.Н. Бутова. – М. : Россельхозакадемия, 2004. – 320 с.
20. Ващекин, Е.П. Повышение полноценности кормления крупного рогатого скота / Е.П. Ващекин // Вестник брянской государственной сельскохозяйственной академии. – 2009. - № 6. – С. 11 – 17.
21. Вершинина, В.Н. Продукты на основе биомассы микроорганизмов / В.Н. Вершинина, Ф.А. Алимов // Лещинская, И.Б. Микробная биотехнология / И.Б. Лещинская, Б.М. Куриненко, В.И. Вершинина. – Казань : Унипресс, 2000. – 368 с.
22. Владимиров, Н.И. Кормление сельскохозяйственных животных : учебное пособие / Н.И. Владимиров, Л.Н. Черемнякова, В.Г. Луницын [и др.]. – Барнаул : Изд-во АГАУ, 2008. – 212 с.
23. Волова, Т.Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова. – Электрон. дан. (2 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – (Введение в биотехнологию : УМКД № 143-2007 / рук. творч. коллектива Т. Г. Волова). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования : Intel Pentium (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 2 Мб свободного дискового пространства ; привод DVD ; операционная система Microsoft Windows 2000 SP 4 / XP SP 2 / Vista (32 бит) ; Adobe Reader 7.0 (или аналогичный продукт для чтения файлов формата pdf).
24. Воробьев, М.М. Создание массового производства новых диетических продуктов питания на основе растительного белка / М.М. Воробьев // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1998. - № 2. – С. 50 – 51.

25. Воробьева, Л.И. Промышленная микробиология / Л.И. Воробьева. – М. : Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
26. Высокотемпературный гидролиз растительного сырья // Р.М. Нуртдинов, С.Г. Мухачев, Р.Т. Валеева [и др.] // Вестник казанского технологического университета. – 2011. - № 10. – С. 204 – 208.
27. Гагкаева, Т.Ю. Фузариоз зерновых культур / Т.Ю. Гагкаева, О.П. Гаврилова, М.М. Левитин [и др.] // Приложение к журналу «Защита и карантин растений». – 2011. - № 5. – 52 с.
28. Гагкаева, Т.Ю. Ячмень, грибы, микотоксины, пиво / Т.Ю. Гагкаева / Материалы IV Международной конференции «Материально-техническая и сырьевая база для солодовенного и пивоваренного производств», 6 – 7 сентября 2012 года. – 26 с.
29. Гнеушева, И.А. Биотехнологические методы обработки растительного сырья / И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская // «Инновационный потенциал молодых ученых - АПК Орловской области». Сборник материалов региональной научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов, посвященной 35-летию Орловского государственного аграрного университета. - Орел: Изд-во Орел ГАУ, 2010. - С. 66 – 68.
30. Гнеушева, И.А. Биотехнологические подходы для получения белково-углеводных кормовых добавок для животноводства / И.А. Гнеушева, И.В. Горькова, В.Н. Дедков // Развитие инновационного потенциала агропромышленного производства: Материалы Всероссийской научно-практической конференции 24 ноября 2010 года. – Орел: Изд-во ОрелГАУ, 2010. – С. 45 – 48.
31. Голязимова, О.В. Увеличение эффективности измельчения лигноцеллюлозного растительного сырья с помощью химической обработки / О.В. Голязимова, А.А. Политов, О.И. Ломовский // Химия растительного сырья. – 2009. - № 2. – С. 53 – 58.

32. Гореликова, Г.А. Основы современной пищевой биотехнологии: Учебное пособие / Г.А. Гореликова. – Кемерово : Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2004. – 100 с.
33. ГОСТ 11960–79. Полуфабрикаты волокнистые и сырье из однолетних растений для целлюлозно-бумажного производства. Метод определения содержания лигнина. – Взамен ГОСТ 11960 – 66 ; введ. 21.12.79. – М. : Издательство стандартов, 1980. – 9 с.
34. ГОСТ 12575-2001. Сахар. Методы определения редуцирующих веществ. – Взамен ГОСТ 12575-86 ; введ. 01.01.03. – Минск : ИПК Изд-во стандартов, 2002. – 15 с.
35. ГОСТ 13496.4–93. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина. – Взамен ГОСТ 13496.4 – 84 ; введ. 01.01.95. – М. : Стандартиформ, 2011. – 18 с. : ил.
36. ГОСТ 13496.7-97. Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности. – Взамен ГОСТ 13496.7-92 ; введ. 01.11.2000. – Минск : ИПК Издательство стандартов, 2000. – 15 с.
37. ГОСТ 26226-95. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения сырой золы. – Взамен ГОСТ 26226-84 ; введ. 01.01.97. – Минск : ИПК Издательство стандартов, 2003. – 8 с.
38. ГОСТ 28178–89. Дрожжи кормовые. Методы испытаний. – введ. 01.07.90. – М. : Стандартиформ, 2007. – 52 с. : ил.
39. ГОСТ Р 51433-99. Соки фруктовые и овощные. Метод определения содержания растворимых сухих веществ рефрактометром. – введ. 01.01.01. – М. : Стандартиформ, 2008. – 7 с.
40. ГОСТ Р 52839–2007. Корма. Методы определения содержания сырой клетчатки с применением промежуточной фильтрации. – введ. 01.01.99. – М. : Стандартиформ, 2008. – 12 с.
41. ГОСТ Р 53046-2008. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности целлюлазы. – введ. 01.01.10. – М. : Стандартиформ, 2009. – 12 с.

42. Градова, Н.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. 2-е изд., перераб. и доп. / Н.Б. Градова, Е.С. Бабусенко, И.Б. Горнова. – М. : ДеЛи принт, 2004. – 144 с.
43. Грачева И.М., Биотехнология биологических активных веществ / И.М. Грачева, Л.А. Иванова. – М. : Элевар, 2006. – 453 с.
44. Грачева, И.М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия / И.М. Грачева, Л.А. Иванова, В.М. Кантере. М. : Колос, 1992. – 383 с.
45. Грачева, И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева, А.Ю. Кривова. – М. : Элевар, 2000. – 510 с.
46. Громов, С.И. Переработка некондиционного сырья на спиртовых заводах / Громов С.И., Устинников Б.А. - М. : Агропромиздат, 1989. – 200 с.
47. Губергриц, А.Я. Лечебное питание: справ. пособие / А.Я. Губергриц, Ю.В. Линеvский. – 3-е изд. перераб. и доп. – К. : Выща шк. Голоvное изд-во, 1989. – 398 с.
48. Гусев, М.В. Микробиология: Учебник для студ. биол. специальностей вузов / М.В. Гусев, Л.А. Минеева. – 4-е изд., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2003. – 464 с.
49. Дедков, В.Н. Биоконверсия соломы злаковых культур грибами рода *trichoderma* в кормовые продукты для животноводства / В.Н. Дедков, И.А. Гнеушева, Н.Е. Павловская // Вестник ОрелГАУ. – 2012. – №4(37). – С. 102 – 105.
50. Денисова, М.Н. Нейтральный способ получения целлюлозы из плодовых оболочек злаков / М.Н. Денисова // Ползуновский вестник. – 2011. - № 4(1). – С. 239 – 243.
51. Доценко, О.Н. Функционально-технологические характеристики белкового продукта дрожжевой биомассы / О.Н. Доценко, В.В. Садовой // Пищевая технология. – 2002. - № 2 – 3. – С. 25 – 26.
52. Евтушенков, А.Н. Введение в биотехнологию : курс лекций / А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев. – Минск : БГУ, 2002. – 104 с.

53. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – 4-е изд., стер. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 208 с.
54. Ездаков, Н.В. Применение ферментных препаратов в кормопроизводстве / Н.В. Ездаков, В.В. Шерстобитов, А.П. Левицкий [и др.] // Перспективы применения ферментных промышленных препаратов в отрасли кормопроизводства. – Киев : Упр. по печати, 1991. – С. 41 – 48.
55. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, М.И. Смирнова-Иконникова [и др.] ; под ред. А.И. Ермакова. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л. : Колос, 1972. – 455 с.
56. Ефимова, М.В. Введение в прикладную биотехнологию : учебное пособие / М.В. Ефимова. – Петропавловск-Камчатский : КамчатГТУ, 2004. – 96 с.
57. Жизнь растений. В 6 т. Т. 2 : Грибы / Под. ред. М.В. Горленко. – М. : Просвещение, 1976. – 479 с.
58. Журавель, Н.В. Амарант - перспективная зернокармальная культура для возделывания на юге России / Н.В. Журавель, В.В. Чумакова // Зерновое хозяйство России. – 2012. - № 2. – С. 18 – 25.
59. Забродский, А.Г. Производство кормовых дрожжей на мелассно-спиртовых заводах / А.Г. Забродский. - М. : Пищевая промышленность, 1972. – 367 с.
60. Закордонец, Л.А. Использование фузариев для обогащения кормов / Л.А. Закордонец, С.М. Супрун, Л.И. Пустовалова // Биотехнология. – 1989. – Т. 5, № 3. – С. 39.
61. Зафрен, С.Я. Как повысить питательную ценность соломы / С.Я. Зафрен. – М. : Колос, 1972. – 89 с.
62. Зафрен, С.Я. Обработка соломы аммиаком / С.Я. Зафрен // Химия в сельском хозяйстве. – 1979. - № 2. – С. 38.

63. Захарченко, И.М. Производство белково-витаминных добавок и премиксов / И.М. Захарченко, А.Е. Баум, А.И. Абрамов [и др.]. – М. : Колос, 1969. – 165 с.
64. Захарченко, И.М. Щелочно-кислый способ повышения питательности соломы / И.М. Захарченко // Советская зоотехния. – 1950. - № 2.
65. Зелтиня, М. Получение кормового белкового препарата из соломы и других малоценных отходов сельского и лесного хозяйства / М. Зелтиня, М. Лейте, А. Апине [и др.] // Биотехника и биотехнология. – 1991. - №4 - 5. – С. 22 – 28.
66. Зельцер, А.М. Кормовая ценность грибного мицелия / А.М. Зельцер, А. Горев, А.В. Медведев // Зоотехния. – 2000. - № 6. – С. 21 – 22.
67. Иванова, В.П. Получение и опыт применения медицинского лигнина. В сб.: Проблемы комплексного использования древесного сырья / Иванова В.П. Тез. докл. Всес. конф. - Рига, 1984. - с. 84 - 90.
68. Иванова, Л.А. Лабораторный практикум по общей биотехнологии / Л.А. Иванова, Л.И. Войно, С.С. Строева. – М. : МГУПП, 2009. – 148 с.
69. Ивашов, В.И. Биотехнология и оценка качества животных кормов / В.И. Ивашов, А.И. Сницарь. – М. : Агропромиздат. – 1991. – 192 с.
70. Имангулов, Ш.В. Нормирование незаменимых аминокислот экономия протеина / Ш.В. Имангулов // Птицеводство. – 2004. - № 8. – С. 34 – 35.
71. Исаченко, Б. Целлюлозное брожение / Б. Исаченко // Энциклопедический словарь / Ф.А. Брокгауз, И.А. Ефрон. – СПб., 1890 – 1907. – Т. 1 – 86.
72. Казаков, Е.Д. Биохимия зерна и зернопродуктов / Е.Д. Казаков, Г.П. Карпиленко. - СПб. : ГИОРД, 2005. – 512 с.
73. Камеры для счета форменных элементов крови и клеточных элементов спинно-мозговой жидкости : техническое описание и инструкция по эксплуатации / Ленинградское орд. Ленина и орд. Октябрьской Революции произв. объединение «Красногвардеец» // [Laboratorium.dp.ua](http://Laboratorium.dp.ua) [Электронный

ресурс] : документация на лабораторное оборудование / Днепропетровская гос. мед. академия, каф. гистологии. – Электрон. текстовые и граф. дан. – Днепропетровск, 2009. – Режим доступа : <http://www.laboratorium.dp.ua>. – Заглавие с экрана.

74. Киреева, В.В. Технология комплексной переработки вегетативной массы растений с получением продуктов пищевого и кормового назначения / В.В. Киреева // Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Приложение. - 2004. - № 6. - С. 46 - 50.

75. Киреева, В.В. Технология комплексной переработки растительного сырья с получением пищевых белковых добавок / В.В. Киреева // Известия ВУЗов. Пищевая технология. – 2004. - № 5 - 6. – С. 50 – 52.

76. Кирик Н.Н. Болезни корневой системы растений / Н.Н. Кирик, М.И. Пиковский // Настоящий хозяин. – 2012. - № 10. – С. 6 – 12.

77. Кирсанов, А.Ф. Технология производства, хранения, переработки и стандартизации продукции животноводства / А.Ф. Кирсанов, Д.П. Хайсанов. – М. : Колос, 2000. – 208 с.

78. Князева, И.А. Разработка биоконверсии отходов переработки зерна в белковые кормовые препараты путем твердофазной и глубинной ферментации их с помощью дрожжевых микроорганизмов : автореферат дис. ... кандидата технических наук : 03.00.23 / И.А. Князева ; Моск. гос. акад. пищевых производств. – М., 1996. – 24 с.

79. Коломейченко, В.В. Современные резервы увеличения производства кормов / В.В. Коломейченко // Вестник ОрелГАУ. – 2007. - № 1(4). – С. 32 – 38.

80. Колосков, С.П. Оборудование предприятий ферментной промышленности / С.П. Колосков. – М. : Пищевая промышленность, 1969. – 386 с.

81. Колошина, Е.А. Ферментные препараты для трудно переваримых компонентов / Е.А. Колошина, Е.М. Чернакова // Комбикорма. – 2003. - № 8. – С. 51 – 52.

82. Кормщиков, П.А. Теория и практика преобразования соломы в ценный корм / П.А. Кормщиков. – Челябинск : Южно-Ур.кн.изд., 1968. – 252 с.
83. Котовский, Л.В. Повышение переваримости соломы путем обогащения ее минерального состава водой / Л.В. Котовский, Е.И. Боровкова // Вестник с.-х. науки. Кормодобывание. – 1940. - № 3.
84. Красильников, О.Ю. Возможности альтернативного кормопроизводства в России / О.Ю. Красильников // Птицеводческое хозяйство. Птицефабрика. – 2011. - № 7. – С. 12 – 14.
85. Крылов, И.А. Комплексная переработка биомассы промышленных микроорганизмов / И.А. Крылов, А.А. Красноштанова, И.И. Гусева. – М. : РХТУ, 2001. – 83 с.
86. Крымова, Е.А. Оценка влияния биологического препарата «Байкал-ЭМ1» на ростовые показатели озимых зерновых культур / Е.А. Крымова // Проблемы агрохимии и экологии. – 2010. - № 2. – С. 50 – 54.
87. Кузнецов, В.Д. Применение дополнительных источников белоксодержащего сырья при производстве пищевых продуктов / В.Д. Кузнецов, А.И. Горшков, Б.П. Суханов // Гигиена и санитария. – 1996. - № 5. – С. 10 – 15.
88. Кураков, В.В. Культивирование парафинассимилирующих дрожжей р. *Candida* с использованием ультрафильтрации для рецикла культуральной жидкости / Кураков В.В., Свитцов А. А., Манаков М.Н. // Труды МХТИ им. Менделеева. - М. - 1987, вып. 149. - с. 108 - 112.
89. Лемешева, М.М. Аминокислотное питание птицы / М.М. Лемешева // Кубанский сельскохозяйственный информационно-консультационный центр Государственное бюджетное учреждение Краснодарского края [Электронный ресурс] / ГБУ Кубанский СИКЦ. – Электрон. текстовые дан. – Краснодар, 2011. - Режим доступа : <http://www.kaicc.ru/otrasli/pticevodstvo/aminokislotnoe-pitanie-pticy>. – Заглавие с экрана.

90. Леснов, А.П. Инновационные разработки производства белковых кормов из свекловичного жома / А.П. Леснов, Г.А. Мхитарян, О.П. Леснова [и др.] // Эффективное животноводство. – 2009. - № 3. - С. 16 – 17.
91. Леснов, А.П. Переработка свекловичного жома в высокобелковые корма / А.П. Леснов // Сахар. – 2010. - № 8. – С. 2 – 5.
92. Леснов, А.П. Применение инновационных технологий производства высокобелковых кормов для свиней / А.П. Леснов // Свиноферма. – 2008. - № 9. – С. 25 – 27.
93. Леснов, А.П. Современные биотехнологии переработки пивной дробины в высокобелковые экологически безопасные корма / А.П. Леснов, А.Н. Лазаревич, С.И. Никитин // Природообустройство. – 2010. - № 4. – С. 26 – 32.
94. Леснов, А.П. Солома как энергетический и белковый источник для животноводства / А.П. Леснов // Машинно-технологическая станция. – 2008. - № 6. – С. 51 – 54.
95. Лиепиньш, Г.К. Сырье и питательные субстраты для промышленной биотехнологии / Г.К. Лиепиньш, М.Э. Дунце. – Рига : Зинатне, 1986. – 156 с.
96. Лобанок, А.Г. Микробный синтез на основе целлюлозы: Белок и другие ценные продукты / А. Г. Лобанок, В. Г. Бабицкая, Ж. Н. Богдановская. - Мн. : Наука и техника, 1988. - 261 с.
97. Магомедов, И.М. Физиологические особенности конкурентоспособности амаранта / И.М. Магомедов // Успехи современного естествознания. – 2008. - № 5. – С. 41 – 43.
98. Макаеева, О.Н. Белки и нуклеиновые кислоты : конспект лекций для студентов / О.Н. Макаеева. – Могилев : Изд-во Могилевского гос. унив. продовольствия, 2004. – 70 с.
99. Манаков, М.Н. Теоретические основы технологии микробиологических производств / Манаков М.Н., Победимский Д.Г. - М. : Агропромиздат, 1990. - 272с.

100. Матвеева, Н.А. Биохимические особенности свойств и переработки растительного сырья : учебно-методическое пособие / Н.А. Матвеева. – СПб. : НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 16 с.
101. Медведева, С.А. Экологическое преобразование производства целлюлозы на основе биотехнологий / С.А. Медведева, Г.П. Александрова, В.А. Бабкин // Химия в интересах устойчивого развития. – 1996. - № 4 – С. 313 – 320.
102. Муравин, Э.А. Агрохимия / Э.А. Муравин. – М. : КолосС, 2003. – 384 с.
103. Мхитарян, Г.А. Современные технологии переработки свекловичного жома / Г.А. Мхитарян, А.П. Леснов, В.М. Ткаченко // Сахарная свекла. – 2009. - № 2. – С. 33 – 35.
104. Нечаев, А.П. Белки из побочных продуктов переработки зерна пшеницы: технологические аспекты, функциональная роль, применение / А.П. Нечаев, В.В. Колпакова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1998. - № 4. – С. 39.
105. Низкотемпературный гидролиз растительного сырья / Р.М. Нуртдинов, Р.Т. Валеева, С.Г. Мухачев [и др.] // Вестник казанского технологического университета. – 2011. - № 15. – С. 150 – 153.
106. Новиков, Ю.Ф. Выращивание микрогрибов методом твердофазной ферментации / Ю.Ф. Новиков, М.М. Рахимов, Ш.Т. Ахмаджонов // Биотехнология. - 1985. - № 4. - С. 12 - 27.
107. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных : справ. пособие / А.П. Калашников, В.И. Фисинин, В.В. Щеглов [и др.]. – 3-е издание переработанное и дополненное. – М. : Изд-во ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии, 2003. – 456 с.
108. Онхонова, Л.О. Использование отходов животноводческих комплексов в производстве кормовых белков методом микробного синтеза / Л.О. Онхонова, А.В. Онхонова, И.Б. Баторова // В мире научных открытий. – 2009. - № 1. – С. 27 – 34.

109. Осадчая, А.И. Биотехнологическое использование отходов растениеводства / А.И. Осадчая, В.С. Подгорский, В.Ф. Семенов [и др.]. – Киев : Наукова думка, 1990. – 96 с.

110. Официальный сайт закваски Леснова [Электронный ресурс] / Агрокорминвест. – Электрон. текстовые и граф. данные. – М., [200-?]. – Режим доступа : <http://cms.zakvaska.ru>. – Заглавие с экрана.

111. Павловская, Н.Е. Получение БАВ из соломы биотехнологическим методом / Н.Е. Павловская, И.В. Горькова, И.А. Гнеушева, В.Н. Дедков // Инновации аграрной науки и производства: Материалы Международной научно-практической конференции 14-15 декабря 2011 года. Сборник статей. – Орел : Изд-во Орел ГАУ, 2011. - С. 124 – 127.

112. Панфилов, В.И. Биотехнологическая конверсия углеводсодержащего растительного сырья для получения продуктов пищевого и кормового назначения : дис. ... д-ра техн. наук : 03.00.23 / В. И. Панфилов ; РГБ ОД. – М., 2004 - 371 с.

113. Пат. 2005789 Российская Федерация, МПК С 12 Р 1/00 А, С 02 F 3/34 В. Способ очистки животноводческих стоков и получение биомассы / М.В. Левчикова, Р.А. Мельник, Л.И. Ульченко, А.А. Ковалев ; заявитель и патентообладатель «Всероссийский институт электрофикации сельского хозяйства». - № 4856861/13 ; заявл. 26.06.1990 ; 15.01.1994, Бюл. № 1. – 6 с.

114. Пат. 2163076 Российская Федерация, МПК7 А 23 К 1/00, А 23 К 1/165, А 23 N 17/00. Способ биоконверсии растительных отходов и установка для его осуществления / А.Г. Пузанков, Г.А. Мхитарян, И.В. Ильин [и др.] ; заявитель и патентообладатель ОАО «Научно-исследовательский институт комплексных проблем машиностроения для животноводства и кормопроизводства». – № 99126854/13 ; заявл. 27.12.1999 ; опубл. 20.02.2001. – 8 с.

115. Пат. 2259209 Российская Федерация, МПК7 А 61 К 35/84, А 23 L 1/054, С 12 N 1/14, С 12 N 1/14, С 12 R 1:77. Штамм гриба *fusarium sambucinum* - продуцент биологически активных веществ / Е.Т. Зуев, Л.М. Брагинцева, Г.И.

Воробьева [и др.] ; заявители и патентообладатели Е.Т. Зуев, Л.М. Брагинцева, Г.И. Воробьева [и др.]. – № 2004105836/13 ; заявл. 01.03.2004 ; опубл. 27.08.2005, Бюл. № 24. – 10 с.

116. Пат. 2354633 Российская Федерация, МПК С 05 F 11/08, С 02 F 3/34. Способ утилизации жиросодержащих отходов и продукт, получаемый этим способом / Н.С. Фунтикова, Н.Б. Сократова, М.С. Тришкин ; заявители и патентообладатели Н.С. Фунтикова, Н.Б. Сократова, М.С. Тришкин. – № 2007124272/13 ; заявл. 28.06.2007 ; 10.05.2009, Бюл. № 13. – 6 с.

117. Пат. 2366931 Российская Федерация, МПК7 G 01 N 21/78. Способ определения содержания редуцирующих веществ в сахаросодержащих средах / Ю.Г. Хабаров, В.А. Вешняков, Н.Д. Камакина ; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО Архангельский гос. технический университет Федерального агентства по образованию (Рособразование) (АГТУ). – № 2008108650/04 ; заявл. 05.03.08 ; опубл. 10.09.09, Бюл. № 25. – 7 с.

118. Пат. 2391859 Российская Федерация, МПК7 А 23 К 1/16, А 23 К 1/14. Способ получения белково-витаминного корма / С.Н. Честнов ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной ответственностью «БИОПРОТЕИН». - № 2007147178/13 ; заявл. 21.12.2007 ; опубл. 20.06.2010, Бюл. № 17. – 10 с.

119. Перегудов, С.И. Микробиологическая переработка растительных отходов / С.И. Перегудов // Комбикорма. - 2005. - № 2. – С. 45 – 46.

120. Перегудов, С.С. Отходы в доходы / С.С. Перегудов // Торгпред. – 2005. - № 1. – С. 28.

121. Перегудов, С.С. Производство комбикормов и кормовых добавок по альтернативной технологии / С.С. Перегудов // Мясная индустрия. – 2005. - № 7. – С. 42 – 44.

122. Подгорская, В.С. Биотехнологическое использование отходов растениеводства / В.С. Подгорская, В.Н. Иванова. - Киев : Наукова Думка, 1990. – 97 с.

123. Подобед, Л.И. На каких дрожжах растет птица / Л.И. Подобед // Животноводство России. – 2007. - № 4. – С. 21 – 22.
124. Подобедов, А.В. Мировое производство сои / А.В. Подобедов, В.И. Тарушкин // Информационный бюллетень «КАРО». – 1999. - № 11-12. – 12 с.
125. Попов, И.С. Протеиновое питание животных / И.С. Попов, А.П. Дмитроченко, В.М. Крылов. – М. : Колос, 1975. – 275с.
126. Попов, П.Д. Расчёт баланса соломы в хозяйстве / П.Д. Попов, М.Н. Новиков // Методические рекомендации ВНИПТИОУ. – Владимир, 1987. – 10 с.
127. Применение соломы зерновых культур на удобрение в Томской области // Рекомендации / ГНУСибНИИТ СО РАСХН. Департамент социально-экономического развития села Томской области. – Томск, 2004. – 10 с.
128. Пройдак, Н.И. Комплексная переработка сеяных трав с получением протеиновых концентратов пищевого назначения / Н.И. Пройдак, Л.Ф. Митасева, В.Е. Барбью // Тез. докл. Межд. научно-технич. конф. «Прикладная биотехнология на пороге XXI века». – М., 1995. – С. 49.
129. Процессы предобработки сырья и глубинное культивирование микроорганизмов / А.Ю. Винаров, Н.И. Цыганкова, Гордеева Е.И. [и др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2004. - № 5. – С. 20 – 22.
130. Пындак, В.И. Смешанные кукурузо-люпиновые посевы: проблемы и перспективы / В.И. Пындак, А.Е. Новиков // Успехи современного естествознания. – 2007. - № 7. – С. 58 – 59.
131. Резник, Н. Кормовой белок из куриного помета и пивного суслу / Н. Резник // Коммерческая биотехнология [Электронный ресурс] / Алкор Био. – Электрон. журн. – С-Петербург, 2004. – Режим доступа : <http://www.cbio.ru>. – Заглавие с экрана.
132. Решение проблемы кормового белка в стране / Минсельхоз России // Министерство сельского хозяйства Российской Федерации [Электронный ресурс] : официальный интернет-портал / ФГУП «ГВЦ Минсельхоза России». – Электрон. текстовые и граф. дан. – М., 2009. – Режим доступа : <http://www.mcx.ru/documents/document/show/8581.191.htm>. - Заглавие с экрана.

133. Сакович, Г.В. Результаты комплексной переработки биомассы / Г.В. Сакович, С.Г. Ильясов, М.С. Василишин [и др.] // Ползуновский вестник. – 2008. - № 3. – С. 259 – 266.
134. Саловарова, В.П. Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов / В.П. Саловарова, Ю.П. Козлов. - М. : Изд-во РУДН, 2001. – 381 с.
135. Секретируемые ферменты мицелиальных грибов: регуляция секреции и очистка внеклеточной протеиназы *Trichoderma harzianum* / Я.Е. Дунаевский, Т.Н. Грубань, Г.А. Белякова [и др.] // Биохимия. – 2000. - Т. 65, № 6. – С. 848 – 853.
136. Сизова, Т.П. Некоторые закономерности распространения почвенных грибов / Т.П. Сизова // Микология и фитопатология. – 1977. - № 5. – С. 377 – 381.
137. Смирнов, К.А. Особенности твердофазной ферментации / К.А. Смирнов, Ю.Д. Алашкевич, Н.С. Решетова // Химия растительного сырья. – 2009. - № 3. – С. 161 – 164.
138. Смирнова, В.Д. Отходы производства концентрированных белковых продуктов из сои как сырье для получения кормовых добавок : автореф. дис. ... канд. техн. наук : 03.01.06 / В.Д. Смирнова ; Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева. – М., 2012. – 19 с.
139. Стейнифорт, А.Р. Солома злаковых культур. Пер. с англ. / А.Р. Стейнифорт. - М. : Колос, 1983. - С. 77 - 178.
140. Степанова, Е.В. Разложение овсяной соломы грибами при жидкофазном и твердофазном культивировании / Е.В. Степанова, О.В. Королева, Л.Г. Васильченко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 1. – С. 74 – 84.
141. Сушкова, В.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества / В.И. Сушкова, Г.И. Воробьева. – М. : ДеЛи принт, 2008. – 216 с.

142. Тарабукин, Д.В. Ферментативные технологии направленной биоконверсии целлюлозо- и крахмалсодержащего растительного сырья : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / Д.В. Тарабукин ; Институт биологии Уфимского научного центра РАН. – Уфа, 2009. – 26 с.

143. Тимощенко, Л.В. Основы микробиологии и биотехнологии / Л.В. Тимощенко, М.В. Чубик. – Томск : Томский политехнический университет, 2009. – 195 с.

144. Ускова, А.В. Влияние физико-химических и микробиологических методов обработки вегетативной части топинамбура на целлюлозу / А.В. Ускова, М.А. Пикозина // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки : сб. ст. студентов, аспирантов и молодых ученых по итогам Вс. н.-практ. конф. посв. 80-летию Сибирского гос. технол. университета / ГОУ ВПО «Сибирский государственный технологический университет». – Красноярск, 2010. – С. 28 – 31.

145. Фицев, А.И. Проблемы и перспективы производства кормового белка в России / А.И. Фицев // Кормопроизводство. - 2003. - № 10. - С. 25 - 31.

146. Холькин, Ю.И. Технология гидролизных производств / Ю.И. Холькин. – М. : Лесная промышленность, 1989. – 496 с.

147. Хохрин, С.Н. Корма и кормление животных / С.Н. Хохрин. – Санкт-Петербург : Лань, 2003. – 512 с.

148. Чекмарев, П.А. Рациональные подходы к решению проблемы белка в России / П.А. Чекмарев, А.И. Артюхов // Достижения науки и техники АПК. – 2011. - № 6. – С. 5 – 8.

149. Чекушина, А.В. Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов *Trichoderma*, *Penicillium* и *Muceliophthora* с увеличенной гидролитической активностью : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 03.01.04 / А.В. Чекушина ; Институт биохимии им. А.Н.Баха. – М., 2013. – 23 с.

150. Чернов, И.А. Специфика биосинтеза высоколизинового белка у растений рода *Amaranthus* L., состав, свойства и технология его выделения из фитомассы амаранта / И.А. Чернов, Г.А. Гасимова, И.А. Дегтярёва, Ю.А.

Куликов // Ученые записки казанского государственного университета. Естественные науки. – 2007. – Т. 149, кн. 4. – С. 8 – 19.

151. Шакир, И.В. Получение углеводно-белковых кормов гетерофазной ферментацией растительного сырья : автореф. дис. ... на соиск. уч. степ. канд. техн. наук : 03.00.23 / И.В. Шакир ; М., 1995. – 21 с.

152. Шевелуха, В.С. Сельскохозяйственная биотехнология / 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.

153. Эрнст, Л. К. Кормовые ресурсы леса / Л. К. Эрнст, З. М. Науменко, С. И. Ладинская. – М. : РАСХН, 2006. – 369 с.

154. Эрнст, Л. К. Переработка отходов животноводства и птицеводства / Л. К. Эрнст, Ф. Злочевский, Г. Ерастов // Вебптицепром – отраслевой портал [Электронный ресурс] / Фаулер. - Электрон. текстовые дан. – Белгород, 2007. – Режим доступа : <http://webpticeprom.ru/ru/articles-processing-waste.html?pageID=1177395301>. – Заглавие с экрана.

155. Atwell, W.A. An overview of wheat development, cultivation, and production / W.A. Atwell // Cereal Foods World. – 2001. - № 46. – p. 59 – 62.

156. Azzam, A. M. Pretreatments of agrocellulosic waste for microbial biomass production with a defined mixed culture / A.M. Azzam, S. Ghoneim, M. Z. Ebrahim // Food Biotechnology. – 1990. - № 4. – p. 474.

157. Bailey, M.J. Proc.-Symp. on Bioconversion of plant raw material by microorganisms / M.J. Bailey, M. Ratto // Helsingin gliopiston microbiologian Laitoksen julkaisuja. – Helsinki, 1983. – p. 105 – 117.

158. Bisaria, R. Mushrooms: Potential protein source from cellulosic residues / R. Bisaria, M. Madan // Enzyme and Microbial Technology. – 1983. – Vol. 5, № 4. – P. 251 – 259.

159. Bisaria, V.S. Review: Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products / V.S. Bisaria, T.K. Ghose // Enzyme and Microbial Technology. – 1981. - № 3. – p. 90 – 104.

160. Carlsson, R. Amaranth species and related species for leaf protein concentrate production / R. Carlsson // Proceedings of 1st Amaranth conf., Rodale Press Inc., Emmaus. – 1977. – P. 83 – 99.
161. Chadd, S.A. Practical production of protein for food animals / S.A. Chadd, W.P. Davies, J.M. Koivisto // Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 29 April – 3 May 2002. – 2004. - № 1. – p. 77 – 125.
162. Crampton, E.W. Protein Problem in Animal Feeding / E.W. Crampton // Can J Comp Med Vet Sci. – 1943. – № 7(11). – p. 321 – 326.
163. Degradation of the minor Fusarium mycotoxin beauvericin by intracellular enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* / G. Meca, A. Ritienib, T. Zhouc, [and other] // Food Control. – 2013. – vol. 33, issue 2. – p. 352 – 358.
164. De-shui, T. Effect of Long-Term Application of K Fertilizer and Wheat Straw to Soil on Crop Yield and Soil K Under Different Planting Systems / T. De-shui, J. Ji-yun, H. Shao-wen [and others] // Agricultural Sciences in China. – 2007. - № 2 (6). – p. 200 – 207.
165. Doelle, H.W. Microbial cultures in the utilization of cellulosic materials / H.W. Doelle // Biotechnology Advances. – 1984. – Vol. 2, № 1. – p. 1 – 19.
166. Eggeman, T. Process and economic analysis of pretreatment technologies / T. Eggeman, R.T. Elander // Bioresource Technology. – 2005. – № 96. – p. 2019 – 2025.
167. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use / F. Bourdichona, S. Casaregolab, C. Farrokh [and others] // International Journal of Food Microbiology. – 2012. – Vol. 154, № 3. – p. 87 – 97.
168. Harikesh, B.S. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix / B.S. Harikesh, N.S. Brahma, P.S. Satyendra, S.N. Chandra // Bioresource Technology. – 2010. - № 101 (16). – p. 6444 – 6453.
169. Kristensen, J.B. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose / J.B. Kristensen, J. Borjesson, M.H. Bruun, F.

Tjerneld, H. Jorgensen // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2007. - № 40. – p. 888 – 895.

170. Leng, R.A. Requirements for protein meals for ruminant meat production in developing countries / R.A. Leng // *Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 29 April – 3 May 2002*. – 2004. - № 1. – p. 225 – 255.

171. Lijuan, G. Rice straw fermentation using lactic acid bacteria / G. Lijuan, Y. Hongyan, W. Xiaofen [and others] // *Bioresource Technology*. – 2008. - № 99 (8). – p. 2742 – 2748.

172. Mecaa, G. Beauvericin degradation during bread and beer making / G. Mecaa, T. Zhou, X.-Z. Lib [and others] // *Food Control*. – 2013. - № 1 (34). – p. 1 – 8.

173. Mosier, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass / N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y.Y. Lee, M. Holtzapfle, M. Ladisch // *Bioresource Technology*. – 2005. - № 96. – p. 673 – 686.

174. Murray, M.Y. Bioconversion of cereal grain straws to protein-enriched product / M.Y. Murray // *Biotechnology Advances*. – 1983. - № 2. – 371 p.

175. Murray, M.Y. Fermentation of cellulosic materials to mycoprotein foods / M.Y. Murray, Y. Chisti, D. Vlach // *Biotechnology Advances*. – 1993. - № 11. – p. 469 – 479.

176. Ogden, K. Astrein of *Saccharomyces cerevisiae* which grows efficiently on starch / Ogden, K., Tubb R.S. // *Enzyme and Microbial Technology*. - 1985. - v. 7. - №5. - p. 220 — 224.

177. Olempska-Bier, Z.S. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review / Z.S. Olempska-Bier, R.I. Merker, M.D. Ditto, M.J. DiNovi // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2006. - № 45. – p. 144 – 158.

178. Patel N. Growth of *Trichoderma reesei* RUT C-30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors / N. Patel, V. Choy, P. Malouf, J. Thibault // *Process Biochemistry*. – 2009. - № 10. – p. 1164 – 1171.

179. Saleh, A.M. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum* / A.M. Saleh, M.F. Nevin, N.H. Ebtsam [and others] // *Journal of Biotechnology*. – 2006. - № 127. – p. 54 – 64.
180. Santos, A.L.F. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide / A.L.F. Santos, K.Y.F. Kawase, G.L.V. Coelho // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2011. – Vol. 56, № 3. – P. 277 – 282.
181. Schnell, D. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover at high solids concentrations / Schnell D., Walter Pamela J., Johnson David K. // *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 1992. – 34 - 35, Complete. - p. 659 - 865.
182. Speedy, A.W. Overview of world feed protein needs and supply / A.W. Speedy // *Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 29 April – 3 May 2002. – 2004. - № 1. – p. 9 – 29.*
183. *The Yeasts : A Taxonomic Study* / Edited by C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout. – Philadelphia : Elsevier, 2011. – Fifth edition. – 2100 p.
184. Thomasa, L. Current developments in solid-state fermentation / L. Thomasa, C. Larrocheb, A. Pandey // *Biochemical Engineering Journal*. – 2013. - № 81. – P. 146 – 161.
185. Tonzuka, T. *Enzymes for Cellulosic Biomass Conversion* / T. Tonzuka, M. Yoshida, M. Takeuchi // Tojo, S. *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems* / S. Tojo. – Waltham : Academic Press, 2014. – Chapter 9. – P. 225 – 242.
186. Toride Y. Lysine and other amino acids for feed: production and contribution to protein utilization in animal feeding / Y. Toride // *Protein sources for the animal feed industry. Expert Consultation and Workshop Bangkok, 29 April – 3 May 2002. – 2004. - № 1. – p. 161 – 167.*
187. Xiuzhi, S.S. *Isolation and Processing of Plant Materials* / S.S. Xiuzhi // *Bio-Based Polymers and Composites* / W. Richard, S.S. Xiuzhi. – Academic Press, 2005. – Chapter 3. – p. 33 – 35.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1 – Рецепты комбикормов для цыплят-бройлеров, применяемые в хозяйстве.

Показатели	Комбикорм (период откорма, суток)			
	ПК – 50 (1–9)	ПК – 51 (10–14)	ПК – 52 (15–25)	ПК – 6 (26–42)
Пшеница	44,97	47,33	53,25	52,08
<b>Ячмень</b>	-	8	15	13
Кукуруза	18	10	-	-
Шрот соевый	26,41	15,08	8,61	3,36
Шрот подсолнечный	-	7	7,89	14
Рыбная мука	5,5	5,5	3	-
Масло подсолнечное	1,97	3,79	4,91	6,1
Отруби пшеничные	-	-	-	1,5
<b>ММ – 60,7%</b>	-	-	4	2
М м/к стаб.	-	-	-	3,85
Известняк	1	1,11	1,26	1,83
Монокальцийфосфат	0,9	0,61	0,33	0,69
Метионин кормовой	0,25	0,16	0,17	0,12
Лизин	0,13	0,22	0,29	0,3
Бикарбонат натрия	0,16	0,14	0,19	0,08
Альфа-треонин	0,06	0,05	0,08	-
Бетафин	0,1	-	-	-
Микосорб	0,05	-	-	-
Соль поваренная	-	-	-	0,1
Broiler стар	0,5	-	-	-
1% рост	-	1	1	-
1% финиш	-	-	-	1
<b>В одном килограмме комбикорма содержится, г</b>				

Сухого вещества	879,8	880,4	886,8	886,8
Сырого протеина	222	200	195,0	195,0
Сырого жира	44,8	62,2	81,1	41,0
Сырой клетчатки	35,4	43	46,5	49,0
Золы	50,9	47,4		
Кальция	10	10,5	11	9,0
Фосфора	7,3	6,5	6,2	7,0
Витамины: А, МЕ/кг	12,5 тыс.	12 тыс.	12 тыс.	10 тыс.
D, МЕ/кг	3 тыс.	3 тыс.	3 тыс.	2 тыс.
E, мг/кг	100	80	80	110
C, мг/кг	100	–	–	–
B <sub>2</sub> , мг/кг	8	6	6	7
B <sub>6</sub> , мг/кг	4	4	4	4
B <sub>12</sub> , мг/кг	0,02	0,02	0,02	0,02

## Приложение 2

МИНИСТЕРСТВО  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

### «ОРЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, 69  
Тел. (486-2) 45-40-50, 45-40-79 Факс 45-40-79

Адрес электронной почты: [pnv@orel.ru](mailto:pnv@orel.ru)

ОКПО 05013607 ОГРН 1025700824698

ИНН/КПП 5753000457/575301001

23.09.13 № 01/1-1925

На № \_\_\_\_\_

## АКТ

о внедрении результатов научно-исследовательской работы  
в учебный процесс.

Мы, нижеподписавшиеся, председатель методической комиссии факультета биотехнологии и ветеринарной медицины Орел ГАУ к.б.н., доцент Горькова И.В., а также заведующий кафедрой биотехнологии д.б.н., профессор Павловская Н.Е., ассистент Дедков В.Н. составили настоящий акт в следующем:

комиссия провела экспертизу учебно-методических комплексов рабочих программ, методических указаний кафедры биотехнологии на предмет использования в учебном процессе результатов исследований, полученных по итогам диссертационной работы Дедкова В.Н. Установлено, что материалы диссертационной работы Дедкова В.Н. используют при проведении занятий по курсам: «Биокатализ» и «Биокаталитические технологии» и «Биоэнергетические ресурсы» для студентов факультета биотехнологии и ветеринарной медицины.

Проректор по учебной работе  
д.э.н., профессор

 Т.И. Гуляева

Председатель методической комиссии,  
к.б.н., доцент

 И.В. Горькова

Зав. кафедрой биотехнологии, д.б.н., профессор

 Н.Е. Павловская

Ассистент кафедры биотехнологии

 В.Н. Дедков

## Приложение 3

### АКТ

о внедрении завершенной научной работы в производство

Закрытое акционерное

общество «Березки»

Орловского района,

Орловской области

« 4 » 06 2013г.

ЗАО «Березки» в лице главного ветеринарного врача Жилкиной Натальи Ивановны, с одной стороны, и ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный Университет» в лице соискателя Дедкова Виталия Николаевича, с другой стороны, составили настоящий акт в том, что кормовые добавки, полученные путем ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья находились в хозяйстве на внедрении в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВПО Орел ГАУ и решением НТС в период с января по май 2013 г.

Хозяйству со стороны ФГБОУ ВПО «Орловский государственный аграрный Университет» были предоставлены следующие кормовые добавки: К.Д.<sub>1</sub> (солома пшеницы + *Trichoderma harzianum*), К.Д.<sub>2</sub> (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1), К.Д.<sub>3</sub> (солома пшеницы + *Fusarium oxysporum*), полученные путем ферментативного гидролиза соломы зерновых культур и последующего выращивания на ферментолізатах микроорганизмов в необходимом количестве. Осуществлялось авторское наблюдение.

Замена в комбикорме для цыплят-бройлеров 10% зерна пшеницы на кормовые добавки оказала положительный эффект и позволила:

- сохранить интенсивность роста цыплят-бройлеров в опытных группах на уровне контроля, а в третьей опытной группе при применении кормовой добавки (солома пшеницы + *Fusarium oxysporum*), увеличить ее по сравнению с контролем на 1,5%;

- повысить сохранность цыплят-бройлеров на 7% при применении кормовой добавки (солома пшеницы + Байкал ЭМ-1) и на 4% при применении кормовой добавки (солома пшеницы + Trichoderma);

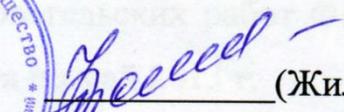
- снизить расход комбикорма на 1 кг прироста цыплят-бройлеров в опытных группах по сравнению с контрольной группой на 5,3 - 5,8%.

В связи с заменой в комбикорме для цыплят-бройлеров 10% фуражной пшеницы на кормовые добавки, мы имеем экономию с каждой головы за весь период выращивания – 238 г зерна пшеницы. В пересчете на 1000 голов цыплят экономия зерна составит 238 кг за период выращивания (42 дня).

В соответствии с вышеизложенным, обе стороны считают, что внедрение кормовых добавок, полученных путем ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья возможно в птицеводческих хозяйствах региона.

Главный ветеринарный  
врач ЗАО «Березки»



  
(Жилкина Н.И.)

Соискатель ФГБОУ ВПО  
Орел ГАУ

  
(Дедков В.Н.)

## Приложение 4

Орловский Государственный Аграрный Университет

Инновационный научно-исследовательский испытательный центр

Испытательная лаборатория

302019, г. Орел, ул. Ген. Родина, 69

Аттестат аккредитации

№ РОСС.RU. 0001.21ПЦ26 от 6 июня 2011 г.

### Протокол исследований

№ 177 от 25.06.2013 г.

1. Наименование образца - **кормовой продукт, полученный путем глубинного культивирования гриба *Fusarium oxysporum* на соломе яровой мягкой пшеницы.**
2. Заказчик: соискатель кафедры биотехнологии Дедков Виталий Николаевич.
3. Сведения по акту отбора: проба отобрана и доставлена заказчиком.
4. Масса пробы: 2 кг
5. Объекты исследований: аутбредные мыши чистопородного скрещивания (Линия/сток CD – 1)  
Опытная группа – 10 особей  
Контрольная группа – 10 особей  
Длительность кормления – 14 суток

### Результаты вскрытия

#### Визуальная оценка

У мышей опытной и контрольной групп на протяжении всего периода наблюдения не было внешних признаков интоксикации. Животные были подвижными и активными, хорошо поедали корм, сохраняя все рефлексы. В результате вскрытия подопытных животных макроскопических изменений со стороны внутренних органов отмечено не было. Патологии со стороны легких и сердца нет. Печень без видимых изменений. Желчный пузырь не растянут, содержимое желчного пузыря желтого цвета. Слизистая оболочка желудка без изъязвлений и гиперемии.

#### Содержание билирубина и общего белка в крови мышей

№ п/п	Показатели	Ед. измер.	Группы	
			Контрольная	Опытная
1.	Содержание общего белка	г/л	61,8±0,95	64,2±1,02
2.	Содержание билирубина	мкмоль/л	7,98±0,15	7,79±0,08

**Заключение:** применение кормового продукта, полученного путем глубинного культивирования гриба *Fusarium oxysporum* на соломе яровой мягкой пшеницы не вызывает патологических изменений в структуре желудочно-кишечного тракта и биохимическом составе крови, на основании чего его можно считать малотоксичным.

Результаты касаются только образца, подвергнутого испытанию

Частичная переработка результатов не допускается!

Дата получения образца: 7 июня 2013 г.

Дата проведения исследований: 10 – 24 июня 2013 г.

Директор ИНИИЦ

Ответственный исполнитель



Ковалева О.А.

Яркина М.В.