

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«Сибирский государственный университет науки и технологий
имени академика М.Ф. Решетнева»**

На правах рукописи



Мамаева Ольга Олеговна

СОСТАВ, СВОЙСТВА И ПЕРЕРАБОТКА ЛИСТЬЕВ ТОПОЛЯ

05.21.03 Технология и оборудование химической переработки
биомассы дерева; химия древесины

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
технических наук

Научный руководитель:
д-р техн. наук, профессор
Исаева Е. В.

Красноярск – 2022

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР	11
1.1 Биологические особенности тополя.....	12
1.2 Химический состав вегетативной части тополя и направления ее переработки.....	15
1.3 Дереворазрушающие грибы.....	20
1.3.1 Общая характеристика грибов рода <i>Pleurotus pulmonarius</i> .	20
1.3.2 Общая характеристика грибов рода <i>Fomitopsis pinicola</i>	22
1.3.3 Общая характеристика грибов рода <i>Trichoderma</i>	24
ГЛАВА 2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1 Характеристика объектов исследования	33
2.2 Методы исследования химического состава листьев	37
2.2.1 Исследование состава спиртового экстракта.....	40
2.2.2 Определение состава минеральных веществ	42
2.2.3 Определение содержания белка и его аминокислотного состава	42
2.2.4 Определение содержания витаминов	44
2.2.5 Определение гуминовых веществ, нуклеиновых кислот и перевариваемости субстрата.....	44
2.2.6 Термических анализ	44
2.3 Твердофазное культивирование	45
2.3.1 Определение ростовых параметров грибов	47
2.4 Анализ биологической активности экстрактов	47
2.4.1 Исследование ростостимулирующей активности водных экстрактов листьев тополя бальзамического	47
2.4.2 Исследование фунгицидных свойств спиртовых экстрактов листьев тополя бальзамического	48

2.5 Определение условий процесса биоконверсии листьев тополя бальзамического	51
2.6 Статистическая обработка экспериментальных данных	51
ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	52
3.1 Химический состав листьев тополя бальзамического	52
3.2 Исследование водозэкстрактивных веществ листьев тополя	57
3.3 Исследование состава липидов и каротиноидов спиртовых экстрактов листьев тополя	58
3.4 Результаты исследования группового состава спиртовых экстрактов листьев тополя	62
3.4.1 Результаты исследования компонентного состава фракций	64
3.5 Микробиологическая переработка вегетативной части тополя...	69
3.5.1 Результаты культивирования базидиомицетов на листьях тополя	70
3.5.2 Биотрансформация субстратов под действием грибов <i>F. pinicola</i> и <i>P. pulmonarius</i> на основе листьев тополя	73
3.5.3 Характеристика белкового кормового продукта	78
3.5.3.1 Аминокислотный состав белка кормового продукта	79
3.5.3.2 Минеральный состав кормового продукта	83
3.5.3.3 Содержание витаминов и нуклеиновых кислот в продуктах конверсии субстратов	85
3.5.3.4 Перевариваемость кормового продукта	87
3.5.4 Результаты культивирования базидиомицетов на смешанных субстратах из вегетативной части растений	88
3.5.5 Результаты культивирования грибов рода <i>Trichoderma</i>	91
3.6 Апробация продуктов переработки листьев тополя для получения биологически активных препаратов	95
3.7 7 Определение условий культивирования базидиальных грибов	107

ГЛАВА 4 ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ЛИСТЬЕВ ТОПОЛЯ	
С ПОЛУЧЕНИЕМ БАВ И КОРМОВЫХ ПРОДУКТОВ.....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	130
ПРИЛОЖЕНИЕ А	163
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	175
ПРИЛОЖЕНИЕ В	186
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	190
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	192
ПРИЛОЖЕНИЕ Е.....	193

ВВЕДЕНИЕ

Тополь является распространенной и быстрорастущей породой древесины, ведутся работы для создания специальных плантаций, что позволит решить проблему восстановления лесных массивов. В процессе заготовки древесины, а также ежегодных обрезок тополей, в том числе городских насаждений, используемых для озеленения, остаются отходы, которые требуют утилизации, при этом не нанося вред окружающей среде.

Кроме того, растительным отходом является опавшая листва, которая перерабатывается ограниченно, основной путь утилизации – это сжигание и вывоз на свалки. Поэтому переработка этой биомассы тополя имеет важное экономическое и экологическое значение.

Известно, что вегетативная часть растений (побеги, почки, листья), в том числе тополя является уникальным источником природных соединений. Естественная возобновляемость древесных растений делает их неисчерпаемым сырьем для производства биологически активных веществ (БАВ). Наиболее полно изученный вид сырья – почки тополя. Экстракты почек тополя, содержащие в своем составе эфирные масла и флавоноиды, обладают высокой биологической активностью [1-4]. В литературе имеются сведения о перспективности использования почек и листьев тополя в качестве источника для получения эффективных антибактериальных и противогрибковых лекарственных средств, белкового и витаминного концентратов [5-7].

В настоящий момент состав и свойства листьев тополя *Populus balsamifera* изучены не в полной мере, а технология их переработки неизвестна. Поэтому создание такой технологии является актуальным направлением, поскольку относится к числу приоритетных фундаментальных и поисковых научных исследований на 2021-2030 г., согласно п. 1.4.3.4. «Технологии глубокой переработки различных видов углеродного сырья» распоряжения правительства РФ от 31.12.2020 №3684-р.

Кроме выделения водо- и спиртоэкстрактивных веществ из листьев тополя, которые обладают биологически активными свойствами, необходимо обратить внимание на остающиеся твердые остатки и возможность их использования для биоконверсии.

Таким образом, **актуальность данной работы** заключается в создании метода переработки листьев тополя, которые являются широкораспространенным, доступным, ежегодно возобновляемым и дешевым растительным сырьем с получением ценных для народного хозяйства продуктов.

Перспективным и быстроразвивающимся направлением в ресурсосберегающих условиях является применение экологически безопасных регуляторов роста растений. В качестве регуляторов роста могут выступать экстракты листьев тополя, на их основе возможно получение как ростостимулирующих препаратов, так и препаратов, обладающих антифунгальной активностью.

Биоконверсия, как способ переработки растительных отходов в ценные продукты для сельского хозяйства, на сегодняшний день является востребованной. Наиболее перспективные продуценты для биоконверсии растительного сырья – базидиомицеты (например, *Fomitopsis* и *Pleurotus*) и аскомицеты (например, микроскопические грибы рода *Trichoderma*). Данные грибы относятся к группе сапрофитов, что дает возможность выращивать их на различных растительных отходах сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности, так как грибы имеют способность использовать в питании целлюлозу и лигнин.

Один из наиболее изученных среди всех видов *Fomitopsis* является *Fomitopsis pinicola* – гриб-трутовик, ксилотроф-космополит, используется в лекарственных целях [8, 9]. Плодовые тела *Pleurotus* традиционно используют в пищевой промышленности для получения белковых продуктов, наиболее перспективным видом является *Pleurotus pulmonarius* [10, 11]. Грибы рода *Trichoderma* применяют в сельском хозяйстве в качестве стимуляторов роста растений и агентов биоконтроля для болезнетворных микроорганизмов и растений [12]. Применение данных продуцентов для твердофазного культивирования на листьях тополя может стать одним из перспективных направлений решения про-

блем дефицита кормового белка, а также получение экологически безопасного препарата типа «Триходермин».

Изложенные в диссертации результаты получены в ходе выполнения работ по проекту «Технология и оборудование химической переработки биомассы растительного сырья» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (номер темы FEFE-2020-0016).

Цели и задачи исследования. Цель работы – изучение состава и свойств листьев тополя (зеленых и опавших), а также создание способа их переработки.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- изучить химический состав листьев тополя бальзамического, исследовать состав и биологическую активность экстрактов;
- определить возможность использования листьев тополя в качестве субстратов для микробиологической переработки грибами PP-3.2 *Pleurotus pulmonarius*, Fp5-15 *Fomitopsis pinicola*, M99-9 *Trichoderma asperellum* и K6-15 *Trichoderma spp.*;
- исследовать химический состав продуктов микробиологической конверсии субстратов на основе листьев тополя и дать оценку возможности их использования в качестве кормовых продуктов и биопрепаратов;
- определить влияние условий культивирования базидиальных грибов PP-3.2 *P. pulmonarius* и Fp5-15 *F. pinicola* на листьях тополя;
- разработать технологию опытного производства переработки листьев тополя с получением биологически активных продуктов, а также рассчитать его основные технико-экономические показатели.

Предмет и объект исследования. Объект исследования: зеленые и опавшие листья тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.).

Предмет исследования: изучение химического состава листьев тополя бальзамического и способов их переработки.

Положения, выносимые на защиту:

- результаты исследования компонентного состава листьев тополя бальзамического (зеленые и опад), в частности, экстрактивных веществ листьев и ком-

понентного состава фракций спиртовых экстрактов;

- результаты твердофазного культивирования грибов РР-3.2 *P. pulmonarius* и Fp5-15 *F. pinicola*, М99-9 *T. asprellum* и К6-15 *Trichoderma spp.* на листьях тополя;

- результаты исследования химического состава кормовых продуктов, полученных в результате микробиологической переработки субстратов на основе листьев тополя;

- результаты апробации по применению продуктов переработки листьев тополя;

- результаты исследований, отражающие влияние условий культивирования базидиомицетов РР-3.2 *P. pulmonarius* и Fp5-15 *F. pinicola* (крупность сырья, температура и продолжительность) на выход кормового продукта;

- разработанная технологическая схема переработки листьев тополя с получением БАВ и кормовых продуктов.

Научная новизна. Разработаны обоснованные технологические решения комплексной переработки листьев тополя, позволяющие получать продукты, обладающие биологической активностью.

Впервые исследован компонентный состав листьев тополя бальзамического; получены новые сведения об антимикробной и ростостимулирующей активности экстрактов листьев тополя бальзамического. На модельных опытах показано, что спиртовые экстракты подавляют рост и развитие грибов *Penicillium* зараженных семян пшеницы. Обработка семян сосны обыкновенной водным экстрактом листьев в два раза увеличивает их ростовые характеристики.

Установлена возможность утилизации листьев тополя и их послеэкстракционных остатков методом биоконверсии. Показано воздействие ферментного комплекса грибов РР-3.2 *P. pulmonarius*, Fp5-15 *F. pinicola*, М99-9 *T. asprellum* и К6-15 *Trichoderma spp.* на лигноуглеводный комплекс субстратов.

Впервые доказана возможность обогащения белком листьев тополя методом биоконверсии с использованием базидиомицетов. Продукт имеет высокий уровень белка (25-30 %), содержание незаменимых аминокислот от 51 до 87 % и ме-

нее 1 % нуклеиновых кислот, перевариваемость более 50 %, что значительно выше по сравнению с традиционными кормами растительного происхождения.

Разработан метод утилизации листьев тополя грибами М99-9 *Trichoderma aspiroillum* и К6-15 *Trichoderma spp.* с получением биопрепарата типа «Триходермин» с высоким титром спор и биогумуса при продолжительности культивирования до двух недель.

Теоретическая и практическая значимость. Разработана экологически безопасная, экономически эффективная и ресурсосберегающая технология по безотходной переработке листьев тополя бальзамического. Технология предусматривает получение экстрактов с последующей переработкой твердых остатков методом биоконверсии. Полученные результаты вносят существенный вклад в решение проблемы комплексного использования растительной биомассы.

Запатентованы способы переработки листьев тополя с получением белкового кормового продукта и препарата типа «Триходермин».

Установлены условия культивирования базидиальных грибов РР-3.2 *P. pulmonarius*, Fr5-15 *F. pinicola* на субстратах из листьев тополя, обеспечивающие получение высокого выхода кормового продукта.

Предложена технологическая схема комплексной переработки листьев тополя. Проведены технико-экономические расчеты, которые показали эффективность предлагаемых технологических решений.

Проведена апробация предлагаемой технологии. Нарботана опытная партия и проведены испытания кормового продукта на токсичность. Установлено, что полученные микробиологической конверсией продукты являются безвредными для животных. Анализ проведен в «Краевой ветеринарной лаборатории» по методикам ГОСТ 31674-2012.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Наиболее существенные результаты, выносимые на защиту, относятся к п. 9 – «Биохимия и микробиологическая переработка растительного сырья» и п. 13 – «Химия и технология переработки древесной зелени, однолетних растений, водорослей и т.д.»

паспорта специальности 05.21.03 – «Технология и оборудование химической переработки биомассы дерева; химия древесины».

Степень достоверности результатов работы. Достоверность научных положений и выводов обеспечена использованием в работе проверенных методов эксперимента и современной аналитической техники, а также статистической обработкой результатов.

Апробация работы. Основные положения диссертации представлялись на международных: «Решетневские чтения» (Красноярск, 2018, 2020, 2021), «Молодежь. Общество. Современная наука, техника и инновации» (Красноярск, 2019), «Biologically active preparations for plant growing: Scientific background – Recommendations – Practical results» (Минск, 2020) и всероссийских: «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (Красноярск, 2020, 2021), «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2020), «Лесной и химические комплексы – проблемы и решения» (Красноярск, 2020, 2021) конференциях.

ГЛАВА 1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

Леса распространены по всему миру и являются доминирующей наземной экосистемой Земли (31 % от общей площади суши). Общая площадь лесов в мире составляет 4,06 млрд га. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации объединенных наций (ФАО, 2020 г.) большая часть мировых лесов (54 %) находится в Российской Федерации (815), Бразилии (497), Канаде (347), Соединенных Штатах Америки (310) и Китае (220 млн га) [13].

В Российской Федерации Красноярский край является одним из ведущих лесных регионов (на 69,3 % покрыт лесами). Площадь лесов составляет 20,3 % от общего лесного фонда страны – это 164 млн га [14].

Главные лесообразующие породы в Красноярском крае – хвойные, они занимают более 75,9 % лесопокрытой площади, запасы древесины составляют 9,7 млрд м³, на долю елово-пихтовых насаждений приходится 16-17 % (1,6 млрд м³) [14-16].

Объем ежегодной вырубki по хвойным породам в Красноярском крае составляет 48,9 млн м³, из которых 8,3 млн м³ приходится на ель и пихту. Общая масса древесины, которая используется в дальнейшем, составляет 75 % от общего объема заготавливаемой древесины. Крону, часть ствола, вершину, сучья, пни, корни и часть древесной зелени (от 30 до 50 % в общей биомассе) оставляют на лесосеке в качестве отходов лесозаготовок [15, 17, 18].

В настоящее время спрос на древесину непрерывно растет, но восстановление лесных массивов после вырубok при этом низкоэффективно. Решить данную проблему возможно с помощью массового разведения и использования быстрорастущих пород, таких как, например, тополь [19-21]. В Италии, Аргентине, Германии, Польше, Китае и других странах широко практикуется создание специальных плантаций быстрорастущих пород древесины тополя и ивы. В Северной Индии посадки быстрорастущего тополя и эвкалипта составляют от 50 до 60 тыс. га [22].

В России площадь, занятая тополями, составляет примерно 19,75 млн га с запасом древесины 2614,81 млн м³. В некоторых регионах возможна организация быстрорастущих тополевых плантаций, которые позволят выращивать большие объемы древесины на единице площади с получением среднегодового прироста в размере 30-40 м³/га [22]. В процессе заготовки древесины будут образовываться крупнотоннажные отходы вегетативной части, которые необходимо грамотно утилизировать, не причиняя вред окружающей среде.

Помимо древесных отходов, образующихся в процессе заготовки древесины, накапливаются многотоннажные отходы обрезок городских тополей, широко используемых для озеленения, которые также необходимо правильно утилизировать. По неопубликованным данным единой муниципальной геоинформационной системы (ЕМГИС), например, в городе Красноярске насчитывается 23355 тополей (70 % от всех городских насаждений), из них Тополь бальзамический (*Populus balsamifera* L.) – 17390, Тополь черный (*Populus nigra* L.) – 5120, Тополь серебристый (*Populus alba* L.) – 774, Тополь пирамидный (*Populus nigra* var. *italica* M.) – 71 шт. В сравнении с хвойными породами, такими как ель, сосна, лиственница и кедр, количество тополей в городе на 20 % больше. Кроме того, растительным отходом является опавшая листва (опад), которая накапливается и начинает под воздействием природных погодных факторов окисляться и чернеть, мешать движению на дорогах, засорять поверхность озелененных территорий и тем самым портить эстетичный вид города, вследствие чего опад собирают в полиэтиленовые мешки и вывозят за пределы города, что наносит вред окружающей среде. Поэтому утилизация всей биомассы тополя имеет важное экономическое и экологическое значение.

1.1 Биологические особенности тополя

Тополь (*Populus* L.) – одно из самых распространенных деревьев, его можно встретить во всех климатических регионах нашей страны. Существует более 100 видов тополя, на территории Российской Федерации насчитывается около 30

(в средней полосе России около 20) [23, 24]. Многие подвиды тополя произрастают в Америке, Канаде, Китае и Монголии [25]. Тополь отличается высокой скоростью роста и хорошей продуктивностью. По энергии своего роста он обходит такие породы, как обыкновенный ясень и плакучая береза [23]. У тополей быстрый рост (до 1,5 м за сезон), который продолжается до 40-60 лет, после чего замедляется. Некоторые виды тополя могут доживать до 120-200 лет, но обычно растения рано поражаются различными грибковыми заболеваниями. Средняя продолжительность жизни тополя до 60-80 лет [26].

Число видов, входящих в род, может колебаться от 20 до 80 [25]. В данной работе рассмотрена классификация, которая включает в себя следующие таксономические группы: *Turanga*, *Leucoides*, *Aigeiros*, *Tacamahaca* и *Populus*.

Turanga. Наиболее значимым видом является *P. euphratica*, который, способен расти на бедных почвах, переносить соленость почвы и жаркий климат. Данный вид используют в борьбе против опустынивания в Северном Китае [25].

Leucoides Spach. Наиболее распространенным видом является тополь разнолиственный (*P. heterophylla*). Вид обитает на влажных участках в центральных и восточных районах США [25].

Tacamahaca Spach. Тополя бальзамические. Северо-американскими представителями этой группы являются тополь бальзамический – *P. balsamifera*, тополь узколиственный – *P. angustifolia* и тополь волосистоплодный – *P. trichocarpa*. Часто для посадок используется тополь Симона – *P. Simonii*, который распространен в Восточной Азии [25].

Aigeiros Duby. К этой группе относятся черные и трехгранные. Группа включает в себя «настоящие» виды тополя (этот термин относится и к *Tacamahaca*). Следует отметить, что наиболее важными видами являются оскорь – (*P. nigra*). Вид происходит из Центральной и Западной Европы и Северной Африки [25].

Populus L. – Осины. Группа подразделяется на две подгруппы: *Trepidae* и *Albidae*, в которые входят осина и белый тополь, соответственно. Белый тополь – один из первых видов, завезенных из Европы. *Populus* являются одними

из наиболее древних покрытосеменных растений, появившиеся в Японии и Китае во время триасового периода. На сегодняшний день *Populus* распространен по всему Северному полушарию, как в умеренных, так и субтропических зонах. Представители видов встречаются от Аляски и юга Лабрадора до Северной Мексики, а также в Европе, Северной Африке, Гималаях, Китае и Японии [25].

Среди множества древесных пород тополь бальзамический (*Populus balsamifera* L.) является видом, который широко используется как декоративное растение в зеленом строительстве по всей России [26]. Огромная масса листьев тополя способна вбирать в себя около 70 % уличной пыли, грязи и дыма, освежать и обогащать воздух фитонцидами, убивать болезнетворные микробы. Известно, что *Populus* выделяют в несколько раз больше кислорода, чем хвойные деревья. Тополь бальзамический является устойчивым к действию токсикантов, обладает высокой газопоглотительной способностью и низкой скоростью проникновения фитотоксиканта в ткани листа, является перспективным для интродукции в условиях промышленной среды [27-33].

Тополь бальзамический относится к домену Эукариот, к царству Растения, к отделу Цветковые, к классу Двудольные, к порядку Мальпигиецветные, к семейству Ивовые, к роду Тополь. Международное научное название тополя бальзамического – *Populus balsamifera* L. [25, 34].

Существует пять видов бальзамических тополей: тополь лавролистный, растет в Саянах и на Алтае; таласский тополь, произрастает в горах Средней Азии (за исключением Туркмении); тополь душистый, обитает в сибирских лесах в Восточной Сибири (от Прибайкалья до Чукотки и Камчатки); тополь корейский из Приамурья и Приморья, данный вид тополей очень похож на душистый; тополь Максимовича, встречается только на Сахалине и в Приамурье [23, 25].

Populus balsamifera L. – крупное дерево, достигающее в высоту до 35 м и в диаметре от 1 м до 4-5 м, с раскидистой, широкой, яйцевидной кроной. Кора у старых деревьев внизу темно-серая, растрескивающаяся, выше – серая, гладкая. Побеги слегка угловатые, позже цилиндрические, бурые. Ствол прямой, полностью древесный. Листья тополя яйцевидные или эллиптические, блестящие, сверху

темно-зеленые, снизу беловатые, по краю мелкопильчатозубчатые, на длинных голых черешках. В период распускания молодые клейкие листья очень ароматны из-за большого содержания в них смолы [23, 35].

Плод тополей имеет овальную и яйцевидную форму, представляет собой двустворчатую коробочку длиной 6-9 мм. Плодоношение происходит в июне, либо в июле. Цветки в виде сережек образуются в апреле или в мае, перед распусканием вегетативных почек. Каждая сережка имеет несколько десятков одноклеточных капсул, в которых содержится от 10 до 30 семян. Большинство тополей начинают цвести в возрасте 10-15 лет [23, 36].

Дерево имеет мощную корневую систему и высокую продуктивность. Тополь светлюбивое растение, устойчивое к сухости воздуха, к засолению почвы и к сильным морозам [23, 35].

Древесина у тополя мягкая и легкая, благодаря чему она широко используется в целлюлозно-бумажной промышленности, в сельскохозяйственном строительстве и в производстве спичек. Известно, что древесная биомасса тополя (*Populus spp.*) обладает хорошими свойствами горения по сравнению с недревесным твердым биотопливом и ископаемым твердым топливом [37, 38]. В возрасте 20 лет высота бальзамического тополя может достигать 18 м, а запас древесины составляет 400 м³/га.

Таким образом, повышенный интерес к тополю объясняется его биологическими особенностями и хозяйственной ценностью.

1.2 Химический состав вегетативной части тополя и направления ее переработки

Широкое использование вегетативной части тополя объясняется ее химическим составом, наиболее изученными являются почки [6, 24, 39-48]. В России почки тополя – это фармакопейный вид сырья [6].

В работах [49-52] представлены результаты исследования химического состава вегетативной части тополя бальзамического, произрастающего в Средней

Сибири. Показано, что в отличие от тополей других регионов почки содержат больше эфирных масел (до 8,5 %), но меньше флавоноидов (8-12 %). Количество экстрактивных веществ составляет около 50 % от абсолютно сухого сырья (а.с.с.). Доля спирторастворимых веществ в почках и однолетних побегах – 85-87 % от суммы экстрактивных веществ.

В составе полифенолов почек бальзамических тополей установлено наличие таких соединений, как пиностробин, пиноцембрин, хризин, тектохризин и др. Также в составе почек тополя обнаружены протокатеховая, галловая, транс-коричная, п-кумаровая, феруловая и кофейная кислоты [3, 40, 46].

Эфирное масло вегетативной части тополя характеризуется высоким содержанием сесквитерпеноидов в отличие от древесной зелени хвойных пород [46, 51, 53]. Количество этой группы веществ в тополе сибирского региона составляет для почек – 94 %, побегов – 93 %, листьев – 68 % от суммарного масла. Известно, что сесквитерпеноиды вегетативной части тополя бальзамического богаты кислородсодержащими соединениями (в почках – 52,5 %, побегах – 61,7 %, листьях – 57,4 % от суммарного масла) [51].

Смолу и эфирные масла почек тополя, а также дубильные вещества, органические кислоты и малоизученные гликозиды применяют в медицине, парфюмерной промышленности и ароматерапии. Из почек тополя получают мази и настойки, которые применяют как противовоспалительные, жаропонижающие, антисептические, противогрибковые, антиоксидантные и ранозаживляющие средства при ожогах, инфекционных и гнойно-воспалительных поражениях кожи и мягких тканей. По химическому составу и фармакологической активности препараты на основе почек тополя близки к прополису [6, 40-48, 54, 55].

Антисептические свойства экстрактов почек тополя связывают с наличием в их составе фенолкарбоновых кислот и флавоноидов [56].

За рубежом почки и кора тополя также используются как лекарственные средства, обладающие противовоспалительным, противоревматическим, антиоксидантным, ранозаживляющим, антибактериальным действиями [57-65].

Известно, что экстракты тополя бальзамического (Канада) и находящийся в

них саликортин, могут быть использованы для снижения ожирения и резистентности к инсулину [57].

В работе [61] изучено антиоксидантное влияние фенольных соединений экстрактов почек *Populus nigra* на старение кожи. В Польше в области стоматологии проведено исследование по оказанию противовоспалительного действия экстрактов листовых почек *Populus nigra*, которые содержат флавоноиды – пиноцембрин и пирностробин, в отношении фибробластов десны человека [60].

В Казахстане были получены препараты «Тополин» и «Эфматол» на основе масла почек тополя бальзамического, которые тормозят рост опухолей до 65 %, укрепляют кровеносные сосуды, тонизируют, обезболивают, лечат пародонтоз, а также служат прекрасным дезодорантом. Эти препараты успешно прошли клинические испытания в качестве противоопухолевых, ранозаживляющих, а также антимикробных средств и были внедрены в медучреждениях Алматы, Караганды, Астаны и Петропавловска [66-69].

Эфирное масло и спиртовой экстракт почек тополя бальзамического, произрастающего в Красноярске, проявляют антифунгальную активность в отношении грибов рода *Fusarium* и бактерицидное действие по отношению к *Staphylococcus* [41]. Исследования по выявлению противогрибковой и антибактериальной активности эфирного масла почек и экстрактов листьев тополя проводились в отношении разных микроорганизмов, например стафилококка золотистого (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), стрептококка пиогенного (*Streptococcus pyogenes* ATCC 12344), синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) и др. [6, 70-72].

Известно, что твердый послеэкстракционный остаток вегетативной части тополя может быть использован в качестве кормовой добавки для животных [73], а почки тополя – в качестве субстрата для получения биопрепарата типа «Триходермин» для защиты растений [42, 73].

Химический состав листьев тополя бальзамического изучен не в полной мере. Известно, что содержание веществ, экстрагируемых горячей водой, в листьях тополя бальзамического в 1,3 раза выше, чем в почках, и почти в два раза, чем в

ветвях [49, 74, 75]. Основной группой соединений водорастворимых веществ листьев являются углеводы – 22,8 % от а.с.с. или ~ 66 % от абсолютно сухих веществ (а.с.в.) экстракта (выход составляет 34,6 % от а.с.с.). В их составе 55 % приходится на моно-, ди-, и трисахариды, 23 % – коллоидные полисахариды (декстрины, легкогидролизуемые полисахариды, часть пектиновых веществ и др.), 22 % от суммы углеводов составляет крахмал. Также установлено присутствие до 5 % углеводов в спиртовом экстракте листьев [76].

Содержание белка в водном экстракте листьев составляет от 5,8 % (июль) до 12 % (август), в спиртовом – 5 % а.с.с. [75]. Основными являются аспарагиновая и глютаминовая кислоты (19,8), лейцин (9,3) и серин (6,2 % от суммы аминокислот), незаменимых аминокислот – до 33 % [77].

Установлено, что в составе минеральных компонентов водного экстракта листьев тополя присутствуют микроэлементы: марганец – 52; железо – 115; медь – 45; цинк – 36; кальций 30; никель – 3,9 мкг/г от абсолютно сухого остатка (а.с.о.) [49].

В листьях тополя черного содержатся простые фенолы (салицин, популин), фенилпропаноиды, дубильные вещества, витамины С и Е, каротиноиды (неоксантин, виолаксантин, лютеин) и органические кислоты. [78]. В составе листьев тополя Самарской области обнаружены флавоноиды, наибольшее содержание которых установлено в листьях тополя лавролистного и черного (1,6 и 4,1 % соответственно). В листьях бальзамического тополя содержание суммы флавоноидов составляет 2,9 % [79].

В народной медицине в качестве лечебного сырья используют листву и кору тополя [80]. Их применяют в виде настоя при болезнях кровеносных сосудов, злокачественных опухолях, как гемостатическое средство. Листья обладают бактерицидной активностью, а также используются как корм для скота [81]. Зола листьев пригодна для отбеливания холстов. Листья применяют для получения желтой и зеленой красок для тканей [78, 80]. На основе коры и листьев тополя дрожжащего были получены препараты, обладающие противовоспалительным действием [68, 82-84].

Из литературы известно, что препараты, полученные из листьев и почек тополя бальзамического, произрастающего в условиях Красноярского края, могут быть использованы в качестве веществ, регулирующих рост сельскохозяйственных культур [85].

Исследования по выявлению антимикробных свойств экстрактов листьев различных тополей и ив проводились в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus epidermidis*, грамположительных бактерий *Escherichia coli* и дрожжеподобных грибов *Candida albicans*. Установлено, что наиболее высокую антимикробную активность проявляют *P. nigra*, *P. alba*, *P. suaveoles* [70].

Листовой опад перерабатывают ограничено, его используют в качестве компоста [86, 87], для изготовления пеллет [88] и для получения целлюлозных волокон [89]. Литературные сведения о компонентном составе опавших листьев тополя бальзамического отсутствуют.

Из литературного обзора следует, что вегетативная часть тополя представляет интерес как потенциальный источник сырья для химической технологии, продуктами которой являются эфирные масла, воска, спиртовые экстракты и др. Наряду с почками, экстракты листьев *Populus balsamifera* обладают противоопухолевой, противовоспалительной, ранозаживляющей активностью, оказывают бактерицидное, а также росторегулирующее влияние на сельскохозяйственные растения.

В настоящий момент технология переработки листьев тополя *Populus balsamifera* неизвестна. Поэтому создание такой технологии является актуальным направлением. Кроме выделения водо- и спиртоэкстрактивных веществ из листьев тополя необходимо обратить внимание на остающиеся твердые остатки, которые возможно использовать для биоконверсии. Опавшие листья тополя, как субстрат для микробиологической конверсии, вовсе не изучались. Таким образом, комплексный подход к переработке такого вида растительного сырья имеет важное экономическое и экологическое значение.

Для биоконверсии возобновляемых растительных отходов важным этапом является выбор биологических объектов, которые способны к ее эффективной и

технологичной биодеструкции. Перспективными продуцентами для конверсии лигноцеллюлозного растительного сырья являются дереворазрушающие грибы [90, 91].

1.3 Дереворазрушающие грибы

Дереворазрушающие грибы – это грибы, питание которых основывается на прямом ферментном расщеплении лигноцеллюлозного комплекса древесины. Это сравнительно небольшая по таксономическому разнообразию экологическая группа грибов. Выделяют 900-1700 видов преимущественно афиллофороидных (57–75 %) и агарикоидных (23-37 %) грибов [90, 93].

Разложение древесины – это длительный процесс, протекающий в три стадии. Каждая стадия отличается комплексом грибов, характерных именно для данной фазы. Первая стадия осуществляется сумчатыми и несовершенными грибами. Вторая – базидиальными дереворазрушающими грибами, в основном трутовыми. Третья стадия протекает под влиянием подстилочных сапротрофов и является самой продолжительной [94-96].

Адекватный подбор продуцентов для культивирования на растительных субстратах является определяющим при разработке технологии переработки растительных древесных и недревесных отходов.

Большинство дереворазрушающих грибов принадлежит к классу базидиомицетов. Из литературы известно, что мицелиальную биомассу базидиомицетов можно использовать как источник биологически активных соединений и пищевых добавок [97, 98], а также для получения кормовых продуктов.

1.3.1 Общая характеристика грибов рода *Pleurotus pulmonarius*

В ряду дереворазрушающих базидиомицетов обращают на себя внимание представители рода *Pleurotus*. Вешенка имеет мощную ферментативную систему (целлюлазы и оксидазы), которая способна расщеплять целлюлозу и лигнин, вы-

зывая при этом белую гниль древесины. Представители рода *Pleurotus* являются съедобными, нетоксичными и непатогенными грибами, богатыми перевариваемым протеином [99]. Эти свойства позволяют использовать грибы рода *Pleurotus* в качестве деструктора растительных отходов с получением, как плодовых тел, так и белкового кормового продукта [100-104].

В работах ряда авторов [100-108] показана возможность использования грибов рода *Pleurotus* для биодеструкции растительных отходов, например, таких как солома [105], пшеничные отруби [106], сахарный тростник [107], ботва капусты [108] и др.

Однако, использование грибов рода *Pleurotus*, а именно *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél, в качестве биодеструктора вегетативной части тополя бальзамического на сегодняшний день не изучалось.

P. pulmonarius – это наиболее культивируемый вид *Pleurotus* в Европе и Северной Америке. *P. pulmonarius* коммерчески культивируется в Новой Зеландии [109]. Пищевая ценность вешенки: сырой протеин – 14-27; жиры – 2; углеводы – 51 % (в пересчете на сухую массу). При 25 % белка этот гриб содержит около половины белка, представленного в курином яйце, и около трети большинства видов мяса [110].

Исследование глубинного мицелия и плодового тела гриба *P. pulmonarius* показала, что гриб в процессе развития может накапливать белка до 32 % от сухой массы. В составе аминокислот: треонин – 6,2 и 5,9; валин – 5,5 и 6,3; лейцин – 7,4 и 7,7; фенилаланин – 4,1 и 3,2, лизин – 5 %, глютаминовая кислота – 14,1-14,9, аланин – 10,5, тирозин – 10, серин – 6,9, аспарагиновая кислота – 6,4-7,2 % соответственно. В составе жирных кислот высока доля ненасыщенных, среди них: мононенасыщенных – 18, диненасыщенных – 21, полиненасыщенных – 16 % от суммы всех жирных кислот. Гриб накапливает 1-4 % нуклеиновых кислот, причем содержание их в глубинной культуре в 3,5 раза ниже, чем в плодовом теле. Содержание полисахаридов составляет 21,2 и 27,6 % соответственно, при этом содержание легкогидролизуемых полисахаридов суммы углеводов примерно близко и составляет около 70-78 %. Содержание тяжелых металлов, таких как свинец,

мышьяк, ртуть и кадмий в мицелии *P. pulmonarius* не обнаружено [101].

В составе вешенки установлено наличие витаминов (групп В, D, РР, А, С), микроэлементов, полисахаридов (бета-глюкан, манит, хитин), клетчатки [111].

Ряд исследований [112-116], проведенных на животных и *in vitro*, показывают, что *P. pulmonarius* и его экстракты могут иметь возможное медицинское применение при широком спектре состояний. Экстракты *P. pulmonarius* обладают антимикробными свойствами и проявляют антиоксидантную активность *in vitro* [117].

Таким образом, приведенные литературные данные по составу и содержанию белков, липидов, нуклеиновых кислот, отсутствию тяжелых металлов, указывают на перспективность использования *P. pulmonarius* в качестве биодеструктора вегетативной части растений для получения белковых кормовых продуктов.

1.3.2 Общая характеристика грибов рода *Fomitopsis pinicola*

Грибы рода *Fomitopsis* обладают богатыми комплексами целлюлозо- и лигнинолитических ферментов. Они начали широко применяться еще в Средние века в европейской медицине и используются до настоящего времени [8, 118]. Наиболее изученным среди всех видов *Fomitopsis* являются *Fomitopsis pinicola*.

Fomitopsis pinicola считается одним из перспективных ксилотрофных базидиомицетов для биотехнологии, включая биоконверсию растительных отходов, благодаря образованию ферментов, позволяющих утилизировать сложные соединения, входящие в состав древесины, а так же высокой скорости роста *in vitro*. Вид *Fomitopsis pinicola* (Sw.: Fr.) P. Karst. – достаточно распространенный гриб-трутовик, сапрофит. Из-за эффективного разложения целлюлозосодержащих материалов эта группа грибов может быть использована в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов [119], в качестве биодеструкторов различных растительных отходов [91, 120, 121].

Fomitopsis pinicola (*F. pinicola*) считается несъедобным и не употребляется людьми в пищу, но обладает лекарственными свойствами, которые используются

в гомеопатии и в китайской народной медицине. Так, исследования [122, 123] показали, что экстракт, полученный из *F. pinicola*, содержит эргостерол и проявляет апоптозный эффект на раковые клетки. В работе [124] показана возможность получения стероидов из гриба *F. pinicola*, которые обладают антимикробной активностью в биотесте с *Bacillus subtilis*. Также в работе [125] исследована антимикробная и противоплесневая активность *F. pinicola* по отношению к *Bacillus coagulans*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* и др.

На основе штаммов *F. pinicola* (Fr.) Karst (ATCC 20036) и *Irpex lacteus* Fr (IFO 5367) получают молокосвертывающий ферментный препарат [126]. Грибы рода *F. pinicola* способны синтезировать протеазы, которые можно использовать в качестве замены, например лакказ [119] и химозина [127].

Был получен штамм базидиомицета *F. pinicola* МТ-5.21, обладающий способностью продуцировать липиды в условиях погруженного культивирования [128].

Исследования биохимического состава водных и этанольных экстрактов мицелия *F. pinicola* показали наличие экстрактивных веществ (до 23 %), полисахаридов (до 135 мг/г), белков (до 8,5 мг/г), флавоноидов (до 47,5 мг/г). Группа флавоноидов представлена в основном дигидрокверцетином и лютеолин-7-гликозидом [8].

Жизненный цикл *F. pinicola* начинается как паразита на поврежденных деревьях, затем он продолжает расти как сапрофит на сухостое, валежнике, пнях лиственных и хвойных пород, особенно ольхи, берёзы, граба, бука, сосны, ели, пихты и др. [129-131].

Один из самых распространенных трутовиков, образует множество базидиом на одном стволе. Вызывает бурую деструктивную гниль. Встречается в древостоях всех зон растительности от зоны лесостепи до подзоны северной тайги. Широко распространен на европейской, североамериканской и российской земле [132].

Следует отметить, что *F. pinicola* является малоизученным в области полу-

чения белковых кормовых продуктов. Поэтому дальнейшее исследование гриба, его отдельных штаммов как продуцента белка является актуальным для получения белковых кормовых продуктов на растительных отходах, в том числе на вегетативной части тополя.

Также важным направлением является получение биопрепаратов для защиты растений с использованием растительных отходов, что позволяет улучшить фитосанитарное состояние грунтов. Для этой цели широко используют микроскопические грибы [133], в частности грибы рода *Trichoderma* [9, 134, 135].

1.3.3 Общая характеристика грибов рода *Trichoderma*

Trichoderma (Триходерма) является одним из наиболее изучаемых грибов в настоящее время. Род *Trichoderma Pers.: Fr.* был впервые описан более 200 лет назад [133].

Trichoderma составляет значительную часть биомассы грибов почвы. Микроскопические грибы рода *Trichoderma* часто встречаются во влажных тропических и субтропических лесах, в аридных умеренных и северных зонах и даже в более экстремальных нишах – на крайнем севере и крайнем юге [134]. Установлены экологические места обитания некоторых видов грибов рода *Trichoderma* на территории Красноярского края и республик Хакасия и Тыва. Высокая встречаемость изолятов *Trichoderma* отмечена в целинных почвах и почвах лесных питомников [135].

Следует отметить, что виды *Trichoderma* спорулируют не только в почве, но и на древесине, на лесных грибах, на шляпках культурных грибов, где их можно определить с легкостью по массе конидий, окрашенных в зеленый цвет, реже в белый и желтый цвета. Микопаразитизм считают самым важным механизмом действия биоконтрольных грибов рода *Trichoderma*. Микопаразитизм *Trichoderma* обусловлен разрушением клеточной стенки фитопатогенного гриба, повлекшим за собой его уничтожение и гибель. Из этого следует вывод, что ферменты клеточной стенки (вместе с антибиотиками) являются основными факторами биоконтро-

ля. Также грибы можно обнаружить на влажных стенах зданий, как эндофиты, в стволах деревьев влажного тропического леса [134].

Грибы *Trichoderma* способны синтезировать различный спектр метаболитов. Они являются продуцентами ферментов (целлюлаз, пектиназ, хитиназ, ксиланаз, серинзависимых протеиназ и др.), которые используют в пищевой, текстильной, целлюлозно-бумажной промышленности, в производстве моющих средств, в получении спирта и кормовых продуктов [134, 136-141].

Trichoderma также используется для получения компостов и биологической очистки почвы [142]. В работе [143] показана возможность переработки торфа грибами *Trichoderma*. Некоторые штаммы грибов рода *Trichoderma*, такие как *T. harzianum* «М99/5», *T. asperellum* «Mg-6» и *T. asperellum* «ТН-11», можно использовать для очистки сточных вод от фенола и моонитротолуола [144, 145].

Известны также и другие свойства *Trichoderma spp.* Некоторые виды *Trichoderma* способны поражать выращиваемые промышленным способом грибы и строительные конструкции [146-148]. Данные грибы могут быть причиной глубоких микозов и аллергии у людей со сниженным иммунитетом [134, 149].

На основе токсинов, ферментов, антибиотиков грибов рода *Trichoderma* получают препараты для биологического контроля болезней и стимуляции роста растений [150-153]. Примером может служить биопрепарат типа «Триходермин». *Trichoderma* способна подавлять более 60-ти видов патогенов – *Pythium*, *Botrytis*, *Phoma*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Ascochyta*, *Alternaria* и др. [134].

Субстратами для получения Триходермина могут служить различные растительные отходы [154-160]. Для массовой наработки препарата поверхностным способом в разных странах мира используют отруби, солому пшеницы и сорго, торф, зерно, свекловичный жом, стебли кукурузы, виноградные выжимки и шелуху подсолнечника [134].

В ряде работ доказана возможность получения триходермина путем культивирования грибов рода *Trichoderma* на целлюлозных гранулах [155], вегетативной части топинамбура [156], древесной зелени и послеэкстракционных остатках пихты [157], коре пихты [158], одубине коры лиственницы [159].

Получение биопрепарата типа «Триходермин» возможно и на вегетативной части тополя, а именно послеэкстракционном остатке почек и побегов. Биопрепарат на основе штамма Маганский («МГ-97» *T. aspirellum*) содержит $0,22 \cdot 10^9$, штамма Красноярский («10-99» *T. harzianum*) – $0,52 \cdot 10^9$ спор/г [42].

Таким образом, *Trichoderma* является одним из наиболее изучаемых грибов в настоящее время. Причина такого интереса заключается в большой практической и экологической значимости рода. На основе гриба можно получать биопрепарат, который способствует увеличению размера корневой системы, роста и жизнестойкости растений путем контроля ризосферной микрофлоры, процента всхожести семян, повышению накопления питательных веществ и влиянию на обмен растения. Следует отметить, что на вегетативной части растений грибы рода *Trichoderma* растут с большей скоростью, чем на других отходах, например, древесине. Поэтому, использование вегетативной части растений, в том числе тополя, является перспективным направлением.

1.4 Получение и питательная ценность кормовых продуктов

Растительная биомасса является ежегодно возобновляемым ресурсом, что делает ее неисчерпаемым сырьем для производства биологически активных веществ. Кроме выделения экстрактивных веществ, также весьма перспективным направлением является биоконверсия растительного сырья и отходов его переработки с получением ценных для народного хозяйства продуктов.

1.4.1 Получение кормовых продуктов на основе древесной зелени

В настоящее время в качестве кормовых добавок для животных широко применяют витаминную муку из древесной зелени. Принципиальная схема комплексной переработки древесной зелени представлена на рисунке 1.1.

В древесной зелени содержится до 40 % экстрактивных веществ, поэтому на первой этапе переработки предусмотрено их выделение с использованием пара,

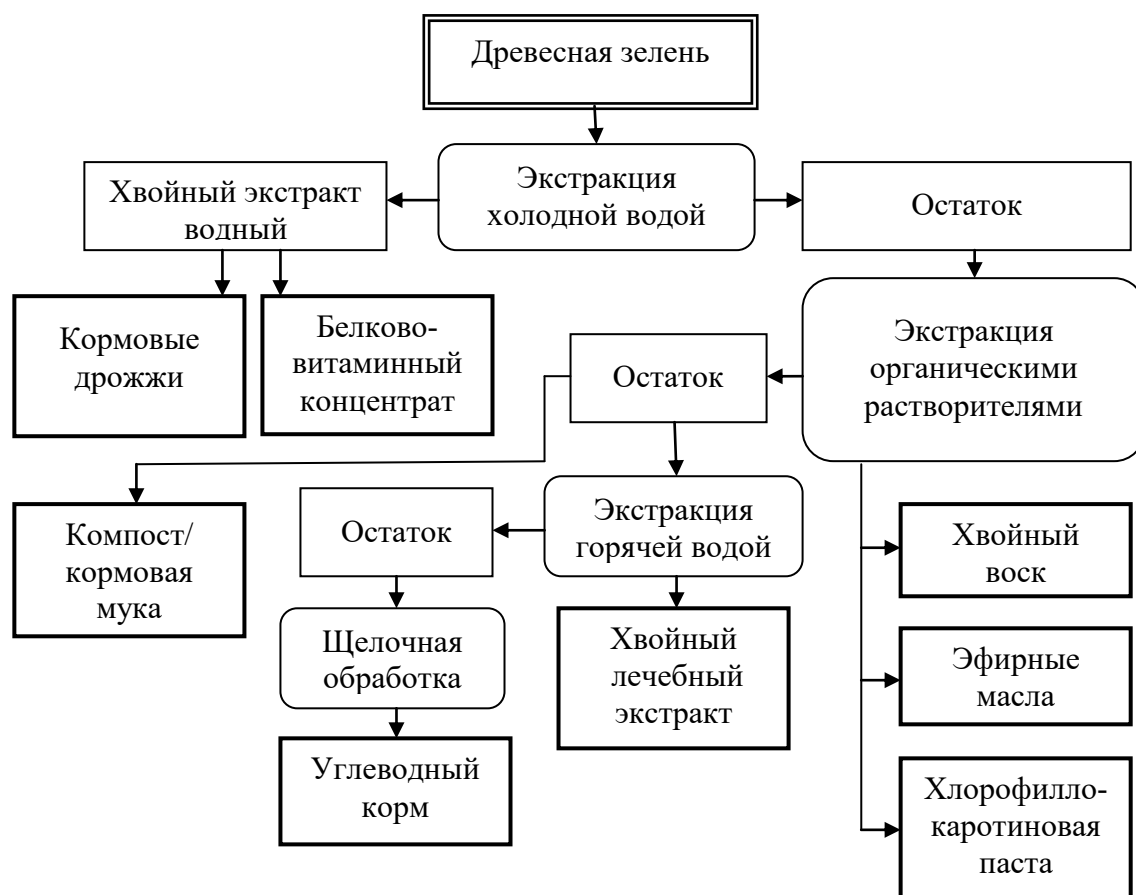


Рисунок 1.1 – Принципиальная схема комплексной переработки древесной зелени

воды и бензина [161-163].

Технология производства непосредственно витаминной муки заключается в быстром (несколько секунд) высушивании древесной зелени и измельчении до частиц размером 1,5-2 мм. Для приготовления витаминной муки применяют сушильные подвижные (СХБП-1,0, СХБП-2,0) и стационарные (АВМ-0,4, АВМ-0,65 и другие) установки [163].

Древесную муку разделяют на хвойно-витаминную (используется ель, кедр, сосна, пихта сибирская) и на лиственнично-витаминную (береза, серая ольха, ива и осина). Основную ценность витаминной муки составляют белки (в хвойной – 7,2-16,6 % и лиственничной муке – 14-16,6 %) и каротин [163].

Древесную муку вводят в состав комбикормов (3-5 % по массе) для всех видов сельскохозяйственных животных, а также в смеси при производстве гранул с соломой (40-50 % по массе).

В таблице 1.1 приведена сравнительная характеристика витаминной муки из древесной зелени и других кормовых добавок, используемых в настоящее время в животноводстве.

Таблица 1.1 – Сравнительная характеристика кормовых добавок

Наименование компонента	Содержание, %				
	витаминная мука из древесной зелени [164]	древесная зелень еловая [165]	сено [166]	листья осины [163]	листья тополя [163]
Зольность	-	3,4	-	2,5-3,2	2,5-3,9
Сырой протеин	-	6,3	7,3	1,7-6,7	2,5-4,4
Каротин, мг/кг	73,7	28,8	-	-	-
Сырая клетчатка	31,7	23,5	28,7	6,0-8,2	6,0-8,0
Кальций, мг/кг	0,92	0,67	-	-	-
Фосфор, мг/кг	0,03	0,15	-	-	-
Перевариваемость органического вещества	-	38,2	-	52,9-64,3	56,2-58,7
Примечание – прочерк указывает на отсутствие данных					

Как свидетельствуют результаты таблицы 1.1, содержание протеина в кормах находится на невысоком уровне, что может приводить к дефициту этого компонента в организме животных. Это подтверждают и литературные данные. Недостаток кормового белка в масштабах планеты по данным ФАО ООН оценивается примерно в 30 млн т в год, а в России – около 2-2,5 млн т [167]. При нехватке в рационе 20-25 % белка происходит увеличение расхода корма в 1,5 раза. Протеин обеспечивает животных ценными аминокислотами, которые необходимы для формирования мышечной массы, качественной шерсти и молока. Из ряда аминокислот, чаще всего в кормах наблюдается дефицит цистина, лизина, метионина и триптофана.

Одним из методов решения этой проблемы – обогащение растительных кормов белком – является биоконверсия [168]. В подразделе 1.3 приведены перспективные продуценты белка. Биоконверсию растительного сырья осуществляют преимущественно твердофазным способом культивирования. В работах [169, 170] показана возможность использования грибов рода *Pleurotus pulmonarius* и

Fomitopsis pinicola для переработки послеэкстракционных остатков древесной зелени пихты и смешанных субстратов на ее основе.

Полученная в процессе биоконверсии субстратно-мицелиальная масса (после высушивания и измельчения) является собственно кормом для животных, который должен соответствовать ряду требований по питательной ценности.

1.4.2 Питательная ценность кормовых продуктов

Питательная ценность кормов – это способность корма удовлетворять потребность организма животного в питательных веществах, таких как белки, жиры, углеводы, витамины и минералы. Питательность корма определяется его химическим составом и переваримостью в пищеварительном тракте животного [170].

Параметрами оценки пригодности растительного материала в качестве кормов являются: содержание протеина, нуклеиновых кислот, клетчатки, витаминов, макро- и микроэлементов [171, 172].

Потребность животных в протеине определяют в основном из расчета на одну кормовую единицу, например, для дойных коров 95-105 г переваримого протеина; для сухостойных коров – 110 г. Для свиней и птицы протеин нормируют в процентах от сухого вещества (например, для молодняка свиней на откорме – 15-17 % сырого протеина в рационе, для кур-несушек – 16-17 %).

На образование 1 кг молочного белка животные затрачивают около 4 кг белков корма, на образование 1 кг белка мяса свиньи – 7 кг растительного белка (овцы – 12,5 кг). В сухих кормах животного происхождения содержится около 70 % сырого протеина, дрожжах – 40-50 %, жмыхах и шротах – до 40 %, зернобобовых – 25-30 %, зерне злаков – 8-12 %, силосе 2-3 %, корнеплодах 1-2 % [173].

Нуклеиновые кислоты присутствуют в кормах как в свободном состоянии, так и в связи с белками, образуя нуклеопротеиды. В избыточном количестве они опасны для животных. Содержание нуклеиновых кислот на 1 кг сухого вещества рациона не должно превышать 9 г, более высокие дозы отрицательно влияют на рост и развитие животных. Например, дрожжи, содержащие большое количество

нуклеиновых кислот, в комбикорма вводят не более 7-10 % [174].

При недостатке клетчатки у животных нарушается деятельность микрофлоры преджелудков, задерживается развитие пищеварительных органов у молодняка и угнетается их моторная функция, а избыток снижает переваримость корма. Потребность в сырой клетчатке составляет: для жвачных животных – 25; поросят – 5-6; лошадей – 16-18; птиц – 4-5 % от сухого вещества рациона. Из растительных кормов наибольшее количество клетчатки содержится в соломе озимых зерновых злаков – 40-45, в соломе яровых злаков и в сене – 20-35, в зеленом корме, силосе – 7-8 % [174].

Витаминная питательность кормов. Источниками всех витаминов для животных являются корма, только в рубце жвачных с помощью микрофлоры синтезируются витамины группы В. Витамины не являются пластическим и энергетическим материалом, они выполняют функции регуляторов обмена веществ и проявляют биологическую активность в малых концентрациях. Витамины необходимы для образования многих ферментов, которые участвуют в обмене веществ [175]. Например, древесная зелень пихты, а в частности хвоя, как самостоятельная кормовая добавка, характеризуется высоким содержанием витаминов С (10 000-15 000 мг), Р (2180-3810 мг), В₁ (8-19 мг) и В₂ (10-11 мг на 1 кг сухого вещества) [176].

В число жизненно необходимых элементов для животных входят макроэлементы (кальций, фосфор, натрий, хлор, магний, калий, сера) и микроэлементы (железо, медь, цинк, марганец, кобальт, йод) [175].

Также, одним из важных показателей качества является перевариваемость кормового продукта. Переваримость сухого вещества кормов колеблется в довольно широких пределах от 35-40 до 95-99 %. Продукты с более низкой переваримостью не могут служить кормами, так как они не обеспечивают основных жизненных функций организма. Переваримость питательных веществ у животных разных видов неодинакова. Жвачные животные, имеющие четырехкамерный желудок, переваривают грубые корма лучше, чем животные с однокамерным желудком. Так, свиньи и птицы совершенно не переваривают лигнин, а крупный

рогатый скот может его переваривать до 15-30 % [177].

Выводы к главе 1

В литературном обзоре рассмотрена состав и способы переработки вегетативная часть тополя. Наиболее изученными являются почки тополя. Компонентный состав и биологическое действие экстрактов зеленых листьев тополя бальзамического изучены не в полной мере. Данные о химическом составе опада тополя бальзамического и свойствах его экстрактов в литературе отсутствуют.

Также рассмотрены свойства некоторых макро- и микроскопических грибов и возможность их культивирования на различных растительных субстратах с целью получения БАВ и белковых кормовых продуктов. Применение грибов, как биологических агентов в биоконверсии растительных отходов (отходы сельскохозяйственного производства и деревоперерабатывающей промышленности), должно решить проблему малоотходных технологий. В связи с этим многообещающим биотехнологическим процессом может стать твердофазная ферментация, как собственно растительной биомассы, так и твердых отходов ее химической переработки. Вегетативная часть тополя бальзамического (зеленые и опавшие листья), а также твердые остатки, полученные после извлечения экстрактивных веществ, для биоконверсии грибами *Fomitopsis pinicola*, *Pleurotus pulmonarius* и *Trihoderna* не использовались.

Исходя из вышеизложенной информации, целью настоящей работы является изучение состава и свойств листьев тополя (зеленых и опавших), а также создание способа их переработки.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- изучить химический состав листьев тополя бальзамического, исследовать состав и биологическую активность экстрактов;
- определить возможность использования листьев тополя в качестве субстратов для микробиологической переработки грибами РР-3.2 *Pleurotus*

pulmonarius, Fp5-15 *Fomitopsis pinicola*, M99-9 *Trichoderma asprellum* и K6-15 *Trichoderma spp.*;

- исследовать химический состав продуктов микробиологической конверсии субстратов на основе листьев тополя и дать оценку возможности их использования в качестве кормовых продуктов и биопрепаратов;

- определить влияние условий культивирования базидиальных грибов РР-3.2 *P. pulmonarius* и Fp5-15 *F. pinicola* на листьях тополя;

- разработать технологию опытного производства переработки листьев тополя с получением биологически активных продуктов, а также рассчитать его основные технико-экономические показатели.

ГЛАВА 2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика объектов исследования

Объектом исследования служили зеленые и опавшие листья тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.). Пробы листьев отбирали в течение 2018-2021 гг. (зеленые: июнь, июль, август) и опавшие листьев (сентябрь) на территории г. Красноярска. Сырье высушивали, измельчали (размер частиц 5-6 мм) и хранили в закрытых сосудах при постоянной влажности.

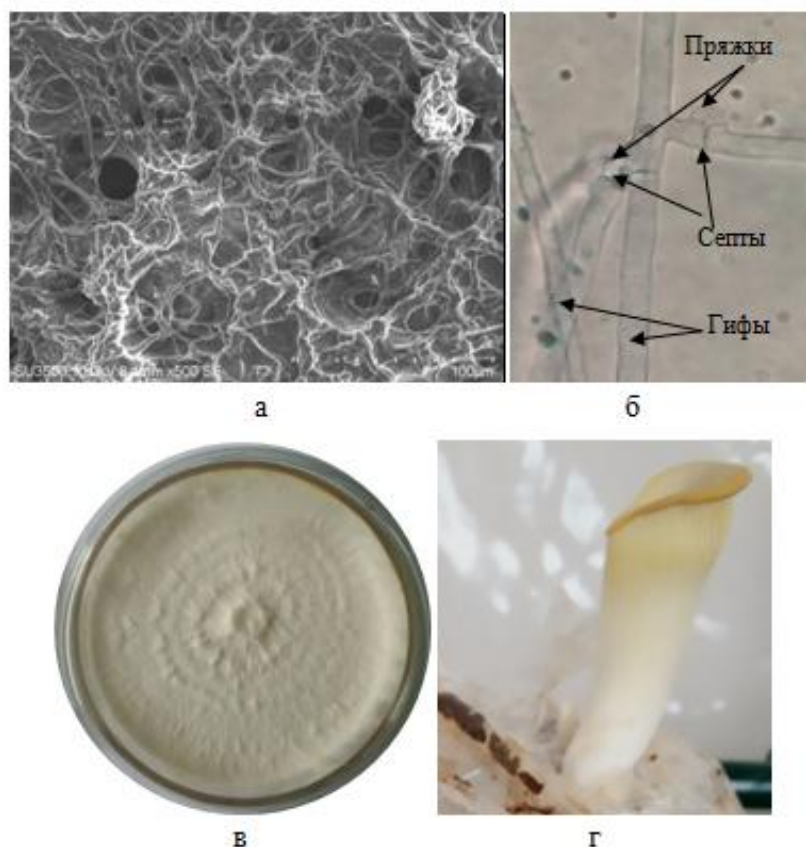
В качестве биодеструктора использовали грибы рода *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél (штамм PP-3.2), *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst (штамм Fp5-15), *Trichoderma* (штамм M99-9 *Trichoderma aspirellum* и штамм K6-15 *Trichoderma spp.*).

Систематическое положение гриба *Pleurotus pulmonarius* (*P. pulmonarius*): надцарство – *Eucariota* (Эукариоты); домен – *Fungi* (Грибы), отдел – *Basidiomycota* (Базидиомикота); класс – *Agaricomycetes* (Агарикомицеты); порядок – *Agaricales* (Агариковые); семейство – *Pleurotaceae* (Вёшенковые); род – *Pleurotus* (Вёшенка); вид вешенка легочная – *Pleurotus pulmonarius* (Вешенка легочная) [178].

Штамм PP-3.2 *P. pulmonarius* хранится в музейной коллекции культур кафедры «Химическая технология древесины и биотехнология» Сибирского государственного университета науки и технологий имени академика М. Ф. Решетнева, г. Красноярск. Штамм был изолирован в чистую культуру из коммерческих плодовых тел и не является патогенным. Морфология гриба PP-3.2 *P. pulmonarius* изучена с использованием световых микроскопов «Olimpus CX41» и электронного микроскопа Hitachi SU3500/Model3500 SEM (рисунок 2.1.)

Мицелий *Pleurotus pulmonarius* представляет собой систему разветвленных септированных гиф толщиной 2-3 мкм, на которых присутствуют одиночные пружки [179].

P. pulmonarius формирует шляпку 4-8 см (до 20 см) в диаметре, языковидную, выпукло-распростертую, с тонким часто надтреснутым краем. Цвет шляпки



а – электронная микрофотография глубинной культуры;
б – оптическая микрофотография глубинной культуры;
в – культура на среде сусло-агар; г – плодовое тело

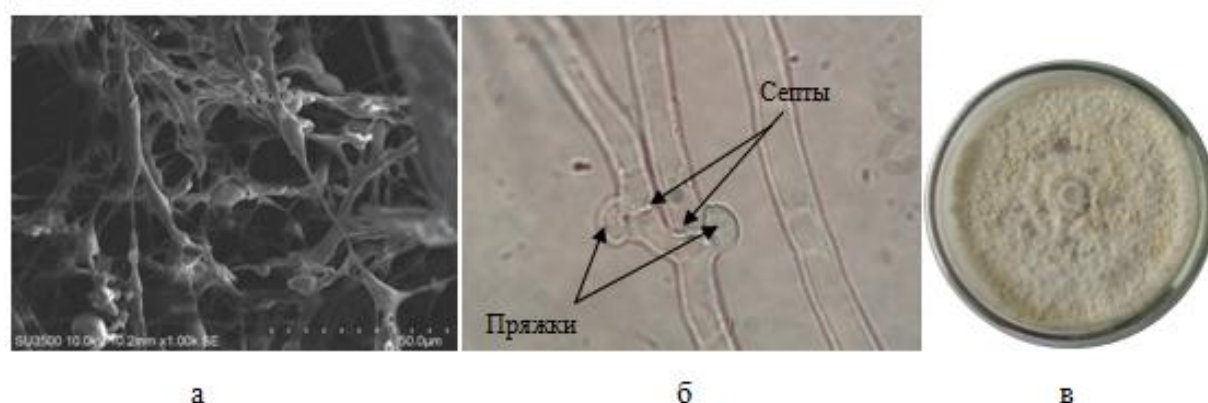
Рисунок 2.1 – Морфология РР-3.2 *P. pulmonarius*

белый или беловато-серый, с возрастом неравномерно желтеет. Мякоть серовато-белая, довольно эластичная, склонная к пересыханию; запах слабый, приятный, особого вкуса не имеет. Ножка боковая (как правило; встречается и центральная), до 4 см в длину, грязно-белая, у основания волосистая. Мякоть ножки жесткая, особенно у зрелых грибов [110, 180]. *P. pulmonarius* образуют споры 7,5-12×3-4,5 мкм, эллипсоидные, иногда слегка миндалевидные, неравнобокие, гладкие, тонкостенные, в массе белые, желтоватые или сероватые [181].

Грибы рода *F. pinicola* (Fr5-15) и *Trichoderma* (M99-9 и K6-15) любезно предоставила профессор кафедры «Химическая технология древесины и биотехнология» СибГУ им. М.Ф. Решетнева, д.б.н., доцент Ю.А. Литовка.

Штамм Fr5-15 *F. pinicola* изолирован из плодовых тел *Fomitopsis pinicola*, произраставшего на живых деревьях лиственницы сибирской в лесном массиве на

территории Емельяновского района Красноярского края. Морфология гриба Fr5-15 *F. pinicola* представлена на рисунке 2.2.



а – электронная микрофотография глубинной культуры;
б – оптическая микрофотография глубинной культуры; в – культура на среде сусло-агар

Рисунок 2.2 – Морфология Fr5-15 *F. pinicola*

Fomitopsis pinicola (Трутовик окаймлённый, имеет еще такие названия как: Древесная губка, Сосновый трутовик, Дубовая губка.), гриб относится к царству *Fungi* (грибы), отделу *Basidiomycota* (Базидиомикота), классу *Agaricomycetes* (Агарикомицеты), порядку *Polyporaceae* (Полипоровые), семейству *Fomitopsidaceae* (Фомитопсисовые), роду *Fomitopsis* (Фомитопсис) [178].

Плодовые тела многолетние, сидячие, приросшие боком. Ножка гриба отсутствует. Форма плодового тела изменчивая, бывает подушкообразной или копытообразной. В молодости округлые или полукруглые, блестящие, липкие, у основания с краснобурым диском, остальное сероватое или ярко-оранжевое с толстым светлым или розоватым округлым краем. Поверхность шляпки волнистая с шишкообразными наростами. Окраска шляпки сначала бледная и неяркая, потом буроватая, в старости темнубурая. Корка на взрослых экземплярах отсутствует, молодой слой трубочек кирпично-красного цвета. Шляпка средних размеров, у старых грибов 15-30 см шириной и до 10 см в высоту, характерной особенностью является наличие хорошо различимых концентрических зон, разделенных углублениями и различных по цвету [130]. Мякоть плотная, упругая, войлочная или напоминающая пробку, изредка деревянистая. На разломе хлопьевидная. Мякоть обычно

имеет светлый желтовато-бежевый или светло-бурый оттенок, но у старых плодовых тел может быть каштанового цвета или даже шоколадно-коричневая.

Гименофор трубчатый, мелкопористый, расположен горизонтально. Поры до 0,5 мм в диаметре, округлые, цельные. Цвет бежевый или кремовый, обычно с розовым оттенком. Споровый порошок светлый, кремовый, беловатый или желтоватый. Спороношение очень обильное. Споры бесцветные, мелкие (6-8×3,5-4 мкм) яйцевидной или эллипсовидной формы [130, 131].

Штамм М99-9 *T. asprellum* выделен из почв Мининского лесного питомника (Емельяновский район, Красноярский край) в 1999 г., а штамм К6-15 *Trichoderma* spp. – из древесины кедра на территории дендрария Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (г. Красноярск, Академгородок) в 2015 г. (рисунок 2.3).



Рисунок 2.3 – Морфология колоний грибов *Trichoderma* на среде сусло-агар

Грибы рода *Trichoderma* относятся к отделу *Deuteromycota* (Дейтеромицеты, или несовершенные грибы), порядку *Hyphomycetales* (Гифомицеты), семейству *Moniliaceae* (Монилиевые). К роду *Trichoderma* относятся следующие виды грибов: *T. lignorum*; *T. harzianum*; *T. viride*; *T. koningii*; *T. polysporum*; *T. longibrachiatum*; *T. pseudokoningii*; *T. reesei*; *T. asprellum*; *T. virens* [134].

Trichoderma имеет бесцветный или светлый мицелий, образующий белые, желтые, чаще зеленые или темно-зеленые колонии. Конидиеносцы вертикально-стоящие, разветвлённые, бесцветные. Конидии одноклеточные, шаровидные или эллипсоидные, собраны в округлые головки [133, 134].

Химический состав растительного сырья и продуктов их микробиологиче-

ской переработки исследован по методикам, принятым в химии растительного сырья и биохимии микроорганизмов.

Схема исследования химического состава листьев и продуктов их биоконверсии представлена на рисунке 2.4.

Схема исследования экстрактов листьев тополя приведена на рисунке 2.5.

2.2 Методы исследования химического состава листьев до и после биодеструкции

Влажность образцов определяли гравиметрическим способом, доводя их до постоянной массы при 105 °С [182].

Водорастворимые вещества выделяли 3-х часовой экстракцией дистиллированной водой (гидромуль 1:50). Количество экстрактивных веществ вычисляли по аликвоте в процентах по отношению к массе абсолютно-сухого образца.

Содержание олигосахаридов в водном экстракте определяли через содержание редуцирующих веществ в пробе до и после инверсии. Инверсию проводили 2 %-й серной кислотой при 100 °С в течение 3 ч. По увеличению концентрации редуцирующих веществ после инверсии находили количество олигосахаридов и декстринов в пересчете на глюкозу [182].

Спирторастворимые вещества растительных субстратов выделяли с помощью 3-х часовой экстракции этиловым спиртом, соотношение материала и экстрагента 1:20. Количество спиртоэкстрактивных веществ вычисляли по аликвоте в процентах по отношению к массе абсолютно-сухого образца [182].

Гидролиз легкогидролизуемых полисахаридов (ЛГП) проводили путем кипячения твердого остатка после спиртовой экстракции с 2 %-й соляной кислотой в течение 3 ч, а трудногидролизуемых полисахаридов (ТГП) – 80 %-й серной кислотой при комнатной температуре в течение 2 ч. Количество моносахаридов в гидролизате определяли эбулиостатическим методом [182].

Лигниновые вещества определяли по остатку после гидролиза трудногидролизуемых полисахаридов. Выход рассчитывали по отношению к абсолютно



Рисунок 2.4 – Общая схема исследования химического состава растительного сырья до и после биодеструкции

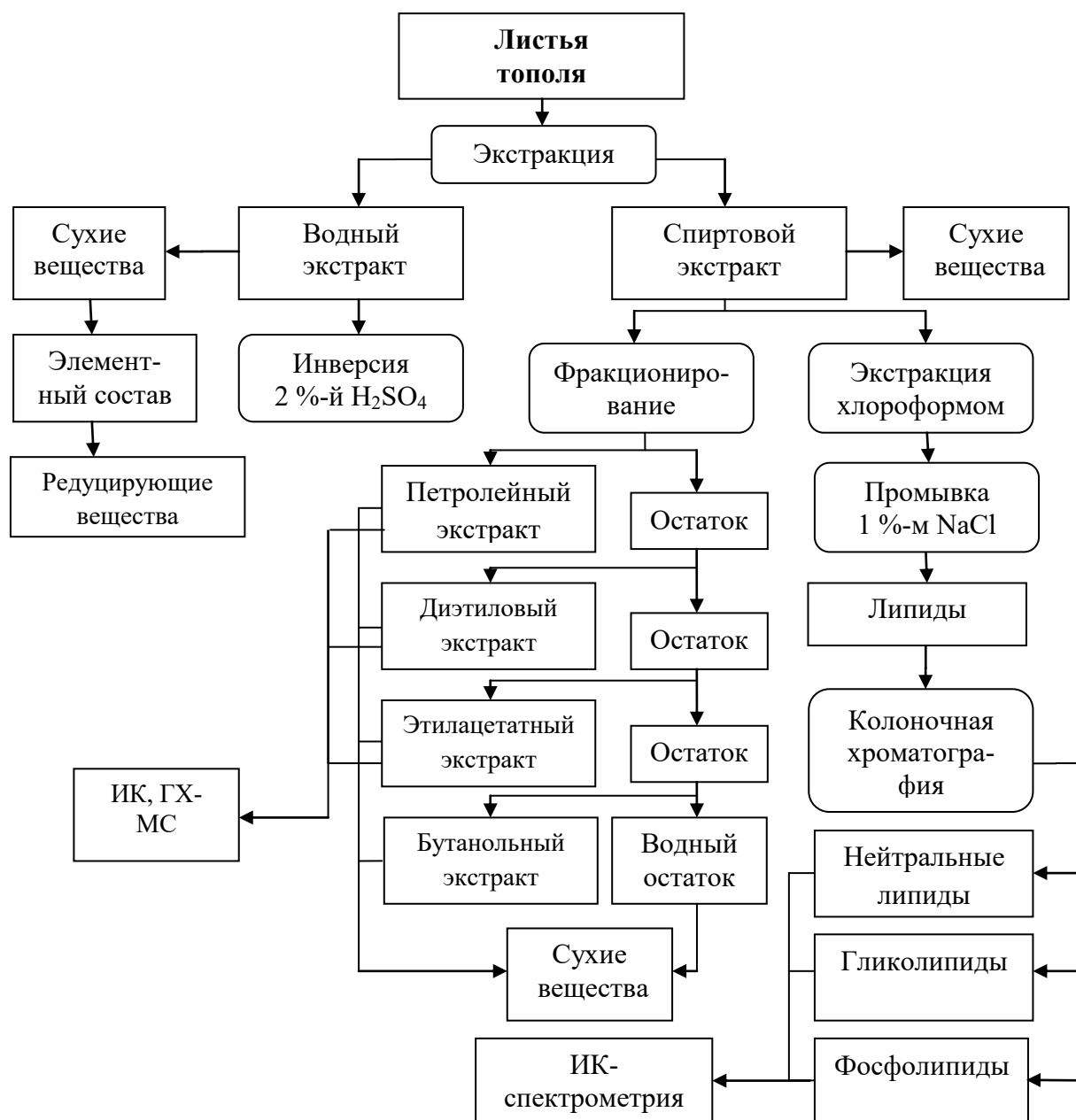


Рисунок 2.5 – Общая схема исследования химического состава экстрактов листьев тополя

сухой навеске [182].

Определение содержания целлюлозы в субстратах на основе листьев тополя до и после биоконверсии определяли азотно-спиртовым методом (метод Кюршнера) [182].

Для определения степени кристалличности целлюлозы рыхлые, объемные образцы прессовали в пластины, которые закреплялись в кювете. Регистрация рентгенограмм выполнена на порошковом рентгеновском дифрактометре D8 ADVANCE (Bruker AXS, ФРГ) в области $5 \div 60^\circ$ углов 2θ . Полученная информация

была обработана с помощью пакета программ, прилагаемых к мат-обеспечению дифрактометра. Анализ выполнен в Институте физики им. Л. В. Киренского СО РАН.

2.2.1 Исследование состава спиртового экстракта

Для фракционирования спиртовых экстрактов использовали растворители с различной полярностью. Для этого спиртовые экстракты упаривали под вакуумом, остаток растворяли в горячей воде и проводили последовательную экстракцию петролейным эфиром (температура кипения 40-70 °С), диэтиловым эфиром, этилацетатом и бутанолом [183]. Количество веществ, переходящих в использованные растворители, определяли весовым методом.

Качественный анализ фракций выполняли на хромато-масс-спектрометре «Agilent 5975C-7890A» фирмы Agilent (США) с использованием автоматического пробоотборника для жидких образцов Agilent 7683. Применяли 30-метровую кварцевую колонку HP-5 (сополимер 5 %-дифенил-95 %-диметилсилоксан) с внутренним диаметром 0,25 мм. Газ-носитель – гелий с постоянным потоком 1,1 мл/мин. Температура колонки: начальный изотермический участок 50 °С (2 мин), подъем температуры со скоростью 4 °С /мин от 50 до 200 °С (0 мин), 20 °С /мин до 280 °С (20 мин). Объем вводимой пробы 0,2 мкл. Температура испарителя – 280 °С, температура ионизационной камеры – 170 °С, энергия ионизации – 70 эВ.

Идентификацию компонентов проводили методом сравнения, по наличию и соотношению характеристичных ионов-фрагментов с использованием базы данных стандартных образцов из масс-спектральной библиотеки «NIST05a. L». Анализ проводили в Институте леса им. В.Н. Сукачева СО РАН.

Для выделения липидов полученный спиртовой экстракт упаривали, остаток перерастворяли в хлороформе. Вместе с липидами в экстракт также переходят углеводы, пигменты, аминокислоты и др. вещества, поэтому полученный раствор промывали 1 %-м раствором хлористого натрия для удаления нелипидный приме-

сей. Количество липидов вычисляли по аликвоте в процентах по отношению к массе абсолютно-сухого материала [182, 184].

Групповой состав липидов. Разделение липидов на группы проводили методом адсорбционной колоночной хроматографии на стеклянной колонке диаметром 2 см, длиной 110 см. В качестве адсорбента использовали силикагель L 100/250 меш., который активировали при 120 °С в течение 3 ч. Отношение массы силикагеля к массе липидного экстракта составило 75:1. Пробу растворяли в хлороформе и вносили в колонку. Содержимое колонки последовательно элюировали следующими растворителями: хлороформ, ацетон и изопропиловый спирт. Скорость элюирования составляла 1-2 мл/мин. При этом последовательно вымывались нейтральные липиды, гликолипиды и фосфолипиды. Далее собирали три фракции, соответствующие каждому растворителю. Расчет содержания липидов каждой фракции вели по аликвоте [182, 184].

Качественный состав липидов листьев тополя устанавливали методом инфракрасной (ИК) спектроскопии. Для получения ИК-спектров образцы липидов растворяли в небольшом количестве диэтилового эфира, наносили тонким слоем на солевую пластинку KBr и быстро высушивали. Регистрацию ИК-спектров исследуемых образцов осуществляли на ИК-Фурье спектрометре IRTraser-100 (Shimadzu, Япония) в области 4000-400 см⁻¹. Полученная спектральная информация была обработана с помощью пакета программ LabSolution IR. Анализ выполнен в лаборатории молекулярной спектроскопии и анализа Института химии и химической технологии СО РАН.

Количественное определение каротиноидов проводили спектрофотометрическим методом. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-26 при 475 нм [185]. Качественный состав каротиноидов листьев тополя устанавливали методом ИК-спектроскопии. Регистрацию ИК-спектров исследуемых образцов осуществляли на ИК-Фурье по условиям, описанным выше.

Тонкослойную хроматографию каротиноидов проводили на пластинах Silufol UV254 в системе растворителей петролейный эфир-этанол [186].

2.2.2 Определение состава минеральных веществ

Исследование элементного состава проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) на масс-спектрометре Agilent-7900 с аргоновой плазмой. Пробоподготовка образцов заключалась в их минерализации смесью H_2O , HNO_3 , H_2SO_4 (в соотношении 1:1:1 по объему). Образцы представляли собой водный раствор и вводились в плазму без разбавления в виде сухого аэрозоля посредством автосамплера и концентрического распылителя. Газ-носитель – аргон. Выполнен анализ образцов на 70 элементов каждый в лаборатории рентгеновских и спектральных методов анализа ИХХТ СО РАН.

Содержание железа (как макрокомпонента) в образцах выполняли методом атомно-абсорбционного анализа (прибор AAnalyst -400, PerkinElmer).

2.2.3 Определение содержания белка и его аминокислотного состава

Содержание общего и легкорастворимого белка в сырье и кормовом продукте определяли с помощью красителя амидо-черного 10В [187]. Методика определения белка в образцах основана на обесцвечивании раствора в результате связывания белком красителя амидо-черного 10 В. Краситель способен количественно связывать растворимые белки и нерастворимые белки, входящие в состав различных клеточных структур [187]. Также содержание белка в субстратах до и после биоконверсии определяли на автоматическом анализаторе содержания белка и азота по методу Дюма в Институте биофизики СО РАН.

Аминокислотный анализ белка проводили на автоматическом анализаторе LA8080 Hitachi методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с постколоночной модификацией нингидрином. Пробы подвергали гидролизу в 6 N растворе соляной кислоты. Навеску пробы массой от 16 до 18 мг взвешивали в виале (объем виалы 8 мл), приливали 6-7 мл раствора 6 N соляной кислоты. Виалу продували аргоном (для вытеснения воздуха) и плотно закручивали крышку и помещали в предварительно нагретую до температуры 110 °C пе-

сочную баню на 22 ч. После завершения гидролиза вials охлаждали до комнатной температуры, взбалтывали и содержимое переносили на беззольный фильтр. Стенки вials дважды промывали дистиллированной водой. Смывы также переносили на фильтры. Фильтрат выпаривали в выпарительной чашке на кипящей водяной бане до образования мокрого осадка. Затем к осадку добавляли 2 мл дистиллированной воды и снова выпаривали для удаления следов соляной кислоты. Выпаренные образцы хранили в эксикаторе над гранулированной щелочью (NaOH или KOH) до анализа. Перед анализом сухой гидролизат (пробу), содержащий смесь аминокислот, растворяли в буфере из расчета 1 мг исходного белка в 1 мл буфера с pH 2,2. Для освобождения от гидрофобных веществ, отравляющих колонку и мешающих разделению использовали картриджи, заполненные слабо-гидрофобным силикагелем. Через картридж (Диапак С-1) пропускали раствор гидролизата в 5 %-м растворе диметилсульфоксида в буфере, используемом для разведения проб. Перед анализом пробу фильтровали через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Для количественной оценки непосредственно перед анализом серии проб в тех же условиях проводили анализ стандартной смеси аминокислот с известной концентрацией (Pickering calibration standard, США). В результате получали хроматограммы с пиками 17-ти аминокислот: лизин, гистидин, аргинин, треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, аспарагиновая кислота, пролин, серин, глютаминовая кислота, глицин, аланин, цистин, тирозин. В процессе кислотного гидролиза триптофан практически полностью разрушается, цистеин окисляется в цистин, аспарагин и глутамин превращаются аспарагиновую и глютаминовую кислоты, соответственно. Анализ проводили в лаборатории экспериментальной гидроэкологии Института биофизики СО РАН. Кроме того, аминокислотный анализ белка проводили на автоматическом анализаторе аминокислот Т 339 М (Чехия) [187].

Биологическую ценность белков рассчитывали по величине показателя скорра [188]. В качестве шкалы сравнения использовали эталонный образец – казеин с оптимальным содержанием незаменимых аминокислот, предложенный Объединенным экспертным комитетом ФАО/ВОЗ [189].

2.2.4 Определение содержания витаминов

Содержание витаминов В₁ (тиамина), Р (рутина) и С (аскорбиновой кислоты) определяли по методике [190].

В основу метода количественного определения В₂ (рибофлавина) и его окисленной и восстановленной форм в растительных тканях положен спектрофотометрический метод анализа рибофлавина в растениях [191]. Оптическую плотность раствора определяли на СФ-26 при 445 нм.

2.2.5 Определение гуминовых веществ, нуклеиновых кислот и перевариваемости субстрата

Гуминовые вещества выделяли трехкратной обработкой 0,1 N NaOH навески (субстрат после биоконверсии) при комнатной температуре и модуле 1:10, содержание рассчитывали в процентах по отношению к массе абсолютно-сухого образца [192].

Содержание нуклеиновых кислот определяли по методу Спирина. В основе метода лежит их экстракция из биологического материала 0,5 моль/л горячей хлорной кислотой с последующим определением оптической плотности на спектрофотометре СФ-26 при 270 и 290 нм [193].

Перевариваемость субстратов до и после биодеструкции определяли по методу А. Р. Жукова с использованием хлорфенольной смеси [194]. Метод основан на способности хлорфенольной смеси растворять органические вещества корма в такой же степени, как и в желудке животного.

2.2.6 Термических анализ

Термический анализ субстратов проводили до и после биодеструкции. Термический анализ (ТА) – метод исследования физико-химических и химических превращений, происходящих в веществе в условиях программированного измене-

ния температуры. Метод основан на свойствах вещества, связанного с его химическим составом и структурой, отображающихся на тепловых изменениях вещества при его нагревании или охлаждении.

Термогравиметрия (ТГ) образцов субстратов проведена с помощью прибора TG 209 F1 (NETZSCH, Германия). ТГ-анализ представляет собой метод термического анализа, который состоит в измерении изменения массы образца в зависимости от температуры. Метод деривативной термогравиметрии (ДТГ) показывает скорость изменения – первую производную ТГ кривой во времени (или температуры).

Образцы проанализированы в атмосфере воздуха при следующих условиях: скорость нагрева $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$ от 25 до $700\text{ }^{\circ}\text{C}$, скорость потока защитного и продувочного газов $20\text{ мл}\cdot\text{мин}^{-1}$; масса образца 8.35-8.67 мг, тигель Al_2O_3 цилиндрической формы. Обработка результатов измерений осуществлялась с помощью пакета программ «NETZSCH. Proteus Thermal Analysis. 4.8.4». Анализ выполнен в Институте леса им. В. Н. Сукачева СО РАН.

2.3 Твердофазное культивирование

В работе использовался твердофазный способ культивирования – это биотехнологический процесс, который протекает в массе измельченного и влажного твердого субстрата, имеющего различную форму и размеры частиц. Этот метод культивирования предназначен для биоконверсии растительного сырья в более ценные продукты, такие как: плодовые тела, кормовые добавки, вторичные ферменты и метаболиты [195].

Подготовку субстратов для твердофазного культивирования проводили следующим образом: измельченный растительный субстрат доводили до 70 %-й влажности водой, помещали в чашки Петри и стерилизовали 30 мин под давлением $1,01\cdot 10^5$ Па несколько раз в автоклаве ВК-75.

Для твердофазного культивирования с целью получения белковых кормовых продуктов использовали: базидиальные грибы рода *Fomitopsis pinicola*

(штамм Fp5-15) и *Pleurotus pulmonarius* (штамм PP-3.2). Для получения биопрепарата типа Триходермин использовали сибирские штаммы микроскопических грибов рода *Trichoderma aspirellum* (штамм M99-9) и *Trichoderma spp.* (штамм K6-15). Чистую культуру грибов высевали на питательную среду сусло-агар. С целью предохранения посевов от загрязнения посторонними микроорганизмами засев проводили в боксе биологической безопасности, оборудованном бактерицидными лампами, в стерильных условиях.

Твердофазное культивирование *F. pinicola*, *P. pulmonarius* осуществляли в чашках Петри при (25 ± 2) °C до полного обрастания субстрата, либо остановки роста штамма. С целью стандартизации посевов в качестве инокулюма использовали блоки (диаметр 8 мм), вырезанные микробиологическим пробойником из зоны роста семисуточной культурой соответствующего штамма.

Также твердофазное культивирование базидиальных грибов осуществляли с помощью засевов в субстратные блоки. Влажность субстрата составляла 65-70 %, высота субстратного блока – 50 мм. В качестве посевного материала использовали глубинную биомассу *F. pinicola* и *P. pulmonarius*.

Для глубинного культивирования использовали синтетическую среду Норкранса (глюкоза – 10 г, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ – 1 г, KH_2PO_4 – 1 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ – 5 мг, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 4,4 мг, MnSO_4 – 5 мг, CaCl_2 – 55,5 мг, витамин В₁ – 40 мг, вода – 1 л). Засев проводили в стерильных условиях методом инъекции посевного материала в подготовленный субстратный блок шприцем Жанне с внутренним диаметром носика шприца 5 мм на глубину 25-30 мм. Инкубирование засеянных блоков проводили в растительных камерах при температуре (25 ± 2) °C и влажности воздуха (60 ± 5) % до полного прорастания субстрата мицелием в течение 15 сут.

Твердофазное культивирование грибов M99-9 *Trichoderma aspirellum* и K6-15 *Trichoderma spp.* осуществляли споровой суспензией музейных штаммов с титром $1 \cdot 10^6$ спор на 1 г субстрата. Посевы инкубировали в термостате при (28 ± 2) °C в течение 21 сут.

2.3.1 Определение ростовых параметров грибов

По мере роста оценивали ростовые параметры культуры по следующим показателям: диаметр и плотность колонии, высота мицелия. Повторность опытов трехкратная. Каждые 2-3 сут, в течение 20 сут измеряли диаметр колонии в двух направлениях. Также наблюдали за их культурально-морфологическими признаками (текстура и форма колоний, пигментация мицелия, наличие экссудата и др.), плотностью и высотой воздушного мицелия. На основании полученных данных вычисляли ростовой коэффициент (РК) и скорость роста колонии (СР, мм/сут) [196].

Штаммы, в зависимости от значений ростовых коэффициентов, условно делили на быстрорастущие ($РК > 100$), растущие со средней скоростью ($РК = 50-100$) и медленно растущие ($РК < 50$) [196].

Урожай конидий грибов рода *Trichoderma* определяли по разности между количеством конидий в конце культивирования (на 100 г субстрата) и исходным количеством конидий (на 100 г субстрата). Титр спор подсчитывали в камере Горяева [158].

Убыль массы субстрата после биодеструкции определяли весовым методом по отношению к исходному субстрату до биодеструкции.

2.4 Анализ биологической активности экстрактов

2.4.1 Исследование ростостимулирующей активности водных экстрактов листьев тополя бальзамического

Определение всхожести семян. Выявление стимулирующего эффекта водных растворов экстрактивных веществ тополя бальзамического на посевные качества семян проводили в лабораторных условиях, согласно требованиям ГОСТ 14161-86 и ГОСТ 13056.6-97 [197, 198]. Выделение экстрактивных веществ из листьев тополя осуществляли экстракцией горячей водой (см. пункт 2.3), водный экстракт

упаривали, для приготовления испытуемого раствора использовали сухой концентрат.

Подготовленные к опытам семена сосны по 100 шт. раскладывали в чашки Петри на влажное ложе, подготовленное из фильтровальной бумаги. Проращивание семян проводили в суховоздушном термостате в чашках Петри. Температура проращивания 22-24 °С. Учет проростков проводили на 5, 7, 10, 15-й день по ГОСТ 14161-86. Известно, что семена некоторых видов, и в том числе сосны, требуют для прорастания свет [199], поэтому при проращивании семян был заложен 7-часовой фотопериод.

Ложе для проращивания семян поддерживали во влажном состоянии. Для увлажнения использовали водные растворы экстрактивных веществ листьев тополя с концентрациями 0,05 и 0,025 %, в качестве контроля – дистиллированную воду. Согласно ГОСТ 13056.6-97 в день каждого подсчета проростков с ложа удаляли нормально проросшие и загнившие семена, количество семян: нормально проросших, загнивших и оставленных на ложе непроросших семян. Энергию прорастания определяли на 7-й день проращивания. В день окончательного учета всхожести у оставшихся на ложе семян определяли количество здоровых, ненормально проросших, загнивших, запаренных, беззародышевых и пустых, зараженных вредителями семян [198].

Для проращивания семян в грунте использовали метод замачивания семян сосны в дистиллированной воде (контроль), а также 0,0125 и 0,025 %-х водных растворов листьев тополя бальзамического. После посева полив проводили раз в пять дней. Продолжительность проращивания 30 дней.

2.4.2 Исследование фунгицидных свойств спиртовых экстрактов листьев тополя бальзамического

Для установления антифунгальной активности были использованы микроскопические грибы, выделенные из зараженной пшеницы Новосибирская 31 (*Triticum aestivum* L.) (образец 1 и 2) и заплесневелого хлеба (образец 3). Микро-

морфологические характеристики полученных образцов изучали в препаратах «раздавленная капля» в микрокамере, используя световые микроскопы «Olimpus CX41» и «Olimpus SZX 12» (рисунок 2.6).

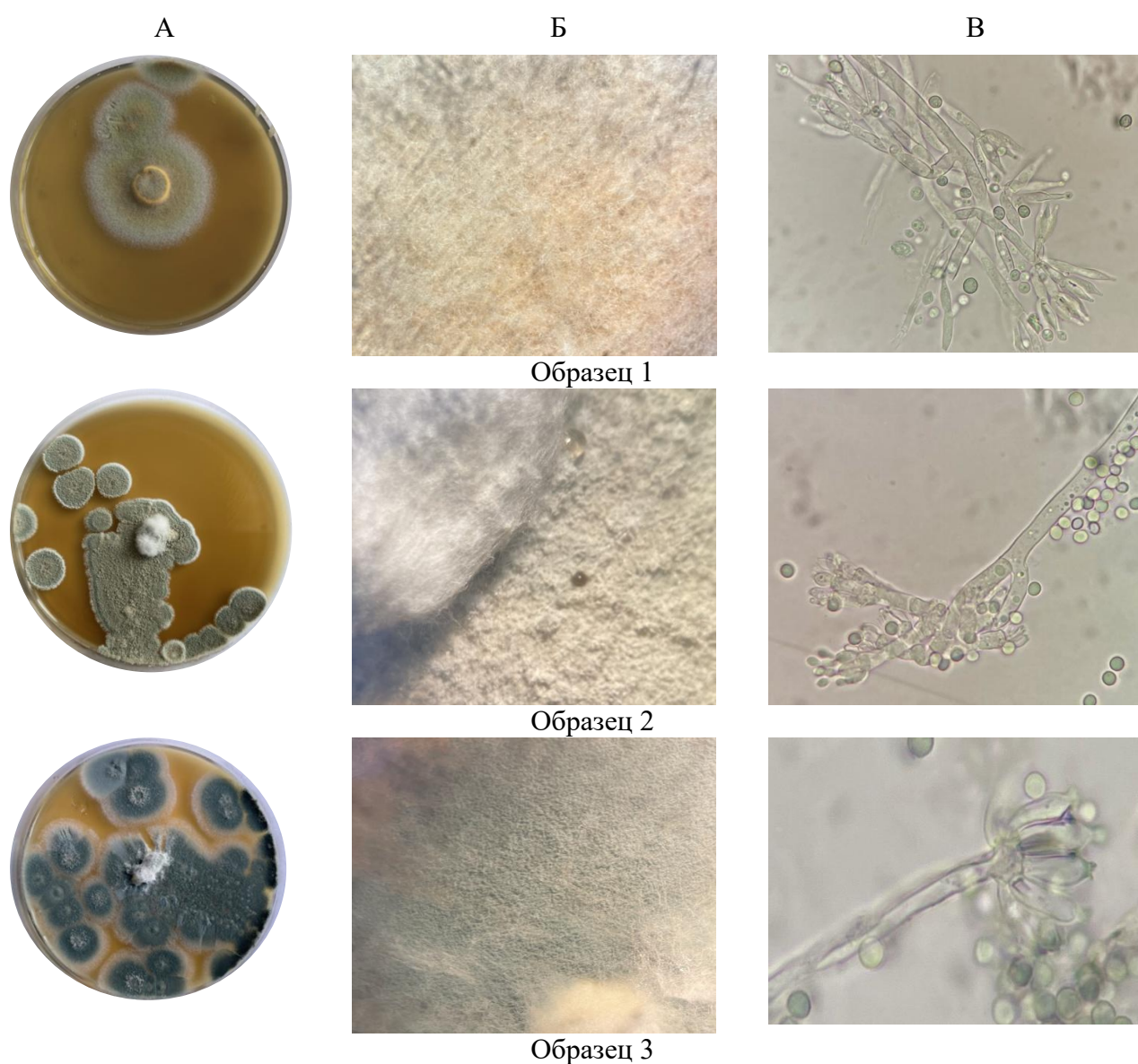


Рисунок 2.6 – Морфология колоний исследуемых образцов на среде сусло-агар (А), под микроскопом Olympus SZX12 (Б), под микроскопом Olympus CX41 (В)

Установлено, что образцы имеют ветвящийся, септированный, бесцветный мицелий. На конидиеносцах размещаются веточки, а на них формируются одно-клеточные цепочки спор – конидии (рисунок 2.6 В). Образцы имеют серовато-голубой и серовато-зеленый цвет. Все это свидетельствует о том, что образцы представляют собой *Penicillium*.

Penicillium – это род грибов-аскомицетов, относящийся к семейству *Aspergillaceae* порядка Эуроциевые (*Eurotiales*). С эколого-трофической точки зрения, виды рода *Penicillium* являются сапротрофами и слабыми паразитами растений [200].

Для изучения влияния спиртового экстракта листьев тополя и его отдельных фракций на ростовые характеристики грибов, выделенные образцы выращивали на суловом агаре при температуре 25-27 °С в течение 7 сут для получения инокулюма. Затем пробойным сверлом диаметром 10 мм из краевой зоны колонии гриба вырезали агаровые блоки и помещали их в центр чашек Петри, куда предварительно была внесена суловая среда, содержащая спиртовой экстракт из расчета 4000 мкг/мл [201]. Далее растворы необходимой концентрации готовили путем асептического внесения исследуемых веществ в колбы Эрленмейера, содержащие стерильную и охлажденную до 40 °С питательную среду. В качестве контроля использовали суловый агар, инокулированный изучаемыми штаммами. Чашки Петри герметично закрывали при помощи клейкой ленты во избежание потерь летучих соединений. Посевы инкубировали при 25-27 °С в течение 10 сут, измеряя диаметр колонии, скорость роста и микроморфологические особенности [202].

Ингибирующую активность спиртового экстракта листьев тополя и его отдельных фракций изучали на зараженном зерне пшеницы Новосибирская 31 (*Triticum aestivum* L.), предоставленном Красноярским аграрным университетом.

Зерно замачивали на 20 мин в соответствующих экстрактах и по 10 шт. (в трех повторностях) раскладывали в чашки Петри на увлажненную стерильной дистиллированной водой фильтровальную бумагу. Проращивание зерна проводили в суховоздушном термостате в чашках Петри. Температура проращивания 22-24 °С. Учет проростков проводили по ГОСТ 12038-84 [203] на 3-й и 7-й день, так как Новосибирская 31 – это сорт мягкой яровой пшеницы.

2.5 Определение условий процесса биоконверсии листьев тополя бальзамического

Разработку режима биоконверсии листьев тополя проводили с использованием математических методов планирования эксперимента, в основу которого был положен план второго порядка – план на кубе (план $Ko-2$) [204]. В качестве параметров оптимизации были выбраны: скорость роста, ростовой коэффициент грибов и выход продукта биодеструкции. В качестве независимых переменных выбраны: температура и продолжительность культивирования. В таблице 2.1 приведены основные факторы и уровни варьирования при проведении эксперимента по оптимизации процесса биоконверсии.

Таблица 2.1 – Уровни факторов и интервалы варьирования

Факторы	Уровни факторов			Интервал варьирования
	-1	0	+1	
x_1 – температура, °C	20	25	30	5
x_2 – продолжительность культивирования, сут	8	10	12	2

Уравнения регрессии и значения факторов процесса биоконверсии получены при помощи пакета программы STATGRAPHICS® Centurion [204].

2.6 Статистическая обработка экспериментальных данных

Экспериментальные исследования проводились на приборах, прошедших метрологическую поверку. Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам [205]. Для полученных результатов рассчитывали среднее арифметическое, ошибку средней арифметической, доверительный интервал. Полученные результаты не выходят за пределы доверительной вероятности $P = 0,95$.

Для математической и статистической обработки данных была использована программа Microsoft Excel.

ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

На сегодняшний день вопросы использования всей биомассы дерева, в том числе вегетативной части, и создания новых технологий, включающих как химическую, так и микробиологическую переработку, остаются вполне актуальными. Наиболее изученным элементом вегетативной части тополя бальзамического, произрастающего в сибирском регионе, являются почки и побеги. Сведения о химическом составе листьев носят фрагментарный характер, а опавшие листья до нас практически не изучали, поэтому первый этап работы был посвящен этому вопросу.

При изучении группового состава листьев (как исходных, так и после их химической и микробиологической переработки) были определены экстрактивные вещества, полисахариды, лигнинные, минеральные и белковые вещества. Для исследования состава экстрактивных веществ использована схема разделения их на водо- и спирторастворимые, с последующим фракционированием полученных экстрактов. Схема исследования листьев приведена в разделе 2 (см. рисунок 2.4 и 2.5).

3.1 Химический состав листьев тополя бальзамического

В работе был исследован компонентный состав зеленых и опавших листьев тополя. Все расчеты приведены на единицу абсолютно сухого сырья (а.с.с.), относительная стандартная ошибка опыта не превышала 5 %. Влажность опавших листьев 7,8 %; зеленых листьев 6,8 %.

Результаты исследования группового состава опавших и зеленых листьев тополя бальзамического (на примере проб, отобранных в июне) представлены в таблице 3.1.

Установлено, что компонентный состав листьев тополя представлен как низкомолекулярными, так и высокомолекулярными соединениями.

Таблица 3.1 – Компонентный состав листьев тополя

Компонент	Содержание, % а.с.с.	
	опад	зеленые
Вещества, экстрагируемые горячей водой	29,2	26,7
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	4,9	29,2
Легкогидролизуемые полисахариды	17,4	11,1
Трудногидролизуемые полисахариды	15,5	12,3
Лигниновые вещества	20,3	13,7
Минеральные вещества	9,6	7,0
Белковые вещества	9,4	12,3
Примечание – относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %		

Следует отметить, что в листьях находится большое количество экстрактивных веществ, содержание которых изменяется в зависимости от вида сырья и от времени сбора. Установлено, что в процессе развития листа содержание экстрактивных веществ снижается с 56 (июнь) и до 32 % (август) [75]. Содержание экстрактивных веществ в опаде составляет 34 % а.с.с., при этом преобладают водозэкстрактивные вещества, на долю которых приходится около 86 % а.с.с. Экстрактивные вещества могут служить источниками углерода для развития микроорганизмов, поскольку содержат подвижные углеводы и липиды, которые будут способствовать росту и развитию грибов [7]. Кроме того, они могут использоваться самостоятельно (флавоноиды, эфирные масла и др.), а в некоторых случаях их удаление повышает доступность растительного субстрата для микроорганизмов при культивировании [7, 39].

Результаты определения компонентного состава исходного сырья показали, что на долю веществ лигнинуглеводного комплекса приходится от 37 % в зеленых листьях до 53 % а.с.с. в опаде. Сумма полисахаридов в зависимости от состава сырья варьирует от 23 до 33 % а.с.с. Доля легкогидролизуемых полисахаридов в общей массе углеводов листьев тополя колеблется в пределах от 47 % (зеленый лист) до 53 % (опад) (таблица 3.1). В процессе развития зеленого листа содержание полисахаридов снижается с 23 (июнь) до 19 % (август) [75].

В составе лигнуглеводного комплекса содержание лигниновых веществ варьируется в пределах от 14 % (зеленые листья) до 20 % (опад).

Как показали наши исследования (см. таблицу 3.1), содержание минераль-

ных веществ в сырье составляет от 7 до 10 % а.с.с. В таблице 3.2 приведен элементный состав основных минеральных веществ компонентов листьев тополя.

Таблица 3.2 – Содержание минеральных веществ в листьях тополя

Наименование	Содержание элементов, мг/кг		Наименование	Содержание элементов, мг/кг	
	опад	зеленые		опад	зеленые
Натрий	0,6	3,4	Марганец	0,4	2,1
Магний	6,6	70,9	Кобальт	0,007	0,005
Фосфор	2,1	11,02	Медь	0,1	0,2
Сера	691,9	4682,0	Цинк	2,3	7,2
Хлор	55,7	<4,6	Селен	<0,04	<0,1
Калий	10,4	28,1	Бром	0,04	<0,1
Кальций	<2,1	<4,5	Стронций	0,1	0,2
Железо	0,9	20,8	Молибден	0,006	0,02
Алюминий	0,3	1,5	Йод	0,1	0,007
Хром	0,03	0,2	Кремний	0,4	0,8

Из данных таблицы 3.2 видно, что, к основным микроэлементам листьев относятся цинк, железо, марганец, йод, алюминий. Известно, что такие микроэлементы, как медь, железо, марганец, молибден, цинк связаны с производством микроорганизмами ферментов, приводящих к разложению лигноуглеводного комплекса [206].

Так как одним из направлений переработки листьев является биоконверсия с получением белкового кормового продукта для животных, важным показателем является наличие тяжелых металлов. Установлено, что содержание в опавших и зеленых листьях свинца (0,01, 0,02 мг/кг), ртути (0,002, 0,005 мг/кг), кадмия (0,01, 0,001 мг/кг), мышьяка (0,005, 0,007 мг/кг) и никеля (0,04, 0,1 мг/кг соответственно) не превышает предельно допустимой концентрации для кормов животных [207].

Содержание белка в зеленых листьях составляет 12,3 %. В опавших листьях отмечено более низкое содержание белкового азота (9,4 %), в связи с тем, что в стареющем листе интенсивность фотосинтеза и дыхания постепенно снижается.

Поскольку сведения о составе белка опавших листьев тополя бальзамического (опад) в литературе отсутствуют, нами был определен аминокислотный со-

став белков листьев. Анализ проводили на автоматическом анализаторе LA8080 Hitachi, результаты представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Аминокислотный состав белков листьев тополя

Аминокислота	Содержание, мг/г сухой массы		Аминокислота	Содержание, мг/г сухой массы	
	опад	зеленые		опад	зеленые
Треонин	6,23	3,44	Цистин	следы	0,50
Валин	7,28	4,44	Аспарагиновая кислота	13,53	7,23
Изолейцин	5,46	3,14	Серин	6,22	4,17
Лейцин	10,09	5,65	Глутаминовая кислота	20,73	10,25
Фенилаланин	6,46	3,31	Глицин	6,79	4,00
Лизин	6,33	3,72	Аланин	7,07	4,08
Метионин	следы	0,96	Тирозин	4,00	2,31
Гистидин	2,45	5,90	Пролин	5,78	3,04
Аргинин	6,08	3,27			

В составе белков листьев идентифицировано 17 аминокислот, в том числе семь незаменимых (треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, лизин) и две условно незаменимые – аргинин и гистидин, на долю которых приходится 49 % (зеленые листья) и 79 % (опад) от общей суммы аминокислот. В опавших листьях так же, как в зеленых, и почках тополя [49] преобладают аспарагиновая и глутаминовая кислоты.

Также в листьях были определены некоторые витамины. Рутин представляет собой комплекс биофлавоноидов, обладающий высокой антиоксидантной активностью, в растениях он содержится в виде гликозидов, обеспечивает защиту от ультрафиолетового излучения, способствует накоплению витамина С. Содержание витамина Р в опаде составило 0,5 мг%, в зеленых листьях – 0,9 мг%.

Важнейшими для роста, развития и размножения грибов являются витамины группы В и С. На примере вешенки устричной (*Pleurotus ostreatus*) показано достоверное увеличение скорости роста при добавлении в питательную среду витамина В₁ [208]. Установлено, что содержание тиамин составляет соответственно 0,03 и 1,1 мг%, аскорбиновой кислоты 0,04 и 0,9 мг%, рибофлавина – 0,04 и 0,7 мг% для опада и зеленых листьев соответственно.

При извлечении из листьев полезных биологически активных компонентов (экстрактивных веществ) остается биомасса, перспективным направлением утилизации которой может стать микробиологическая переработка.

В результате выделения экстрактивных веществ могут образовываться следующие твердые остатки (субстраты):

- твердый остаток зеленых листьев после спиртовой экстракции (влажность 7,1 %) (А);
- твердый остаток зеленых листьев после спиртовой и водной экстракции (влажность 7,4 %) (Б);
- твердый остаток зеленых листьев после водной экстракции (влажность 6,7 %) (В).

Результаты исследования состава твердых послеэкстракционных остатков зеленых листьев тополя (на примере проб, отобранных в июне) представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Компонентный состав послеэкстракционных остатков листьев тополя

Компонент	Содержание в остатке, % а.с.с.		
	А	Б	В
Вещества, экстрагируемые горячей водой	24,4	7,4	7,8
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	9,0	4,8	10,7
Легкогидролизуемые полисахариды	8,7	24,2	22,3
Трудногидролизуемые полисахариды	21,5	26,8	28,9
Лигниновые вещества	25,2	26,2	23,9
Минеральные вещества	11,2	7,6	5,1
Белковые вещества	13,1	-*	-
Примечание – относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %; * – отсутствие данных			

Установлено, что сумма полисахаридов в зависимости от вида остатка варьируется от 30 (А) до 51 % а.с.с. (Б и В). Доля легкогидролизуемых полисахаридов в общей массе углеводов колеблется в пределах от 29 % (А) до 44-47 % (В и Б).

В составе лигноуглеводного комплекса содержание лигниновых веществ находится в пределах от 32 % (В) до 46 % (А).

Таким образом, листья тополя имеют благоприятный химический состав для переработки их с помощью грибов-биодеструкторов. Главную роль для ак-

тивного роста грибов играют соединения, содержащие углерод (полисахариды), так как служат двум основным функциям в метаболизме этих организмов: снабжают собственно углеродом, необходимым для синтеза веществ живых клеток, и участвуют в процессах окисления, где являются единственным источником энергии. Источником азота могут выступать белки и собственно аминокислоты, содержащиеся в листьях тополя. В листьях также присутствуют необходимые микроэлементы и витамины для стимуляции роста грибов.

Растительные субстраты, как правило, биоразрушаемы и безвредны как для фауны, так и для флоры. Вследствие этого продукты на их основе предпочтительнее используемым в настоящее время высокотоксичным продуктам химии.

3.2 Исследование водоекстрактивных веществ листьев тополя

В составе экстрактивных веществ высока доля водорастворимых компонентов, она варьируется от 48 % (зеленые листья) до 86 % (опад). Основной группой соединений водорастворимых веществ зеленых листьев являются углеводы – 9,9 % а.с.с. или ~37,2 % сухих веществ экстракта (с.в.э.), из них на долю олигосахаридов приходится 14,9 %. В опавших листьях количество углеводов в водном экстракте меньше (27 % от с.в.э.), содержание олигосахаридов составляет 9,6 % с.в.э.

Содержание минеральных веществ в экстракте составляет около 12 % с.в.э. Макроэлементы и микроэлементы представляют особую важность для роста и развития растений на всех стадиях жизненного цикла. Элементный состав водного экстракта зеленых листьев тополя представлен в таблице 3.5.

Суммарное содержание макроэлементов (магний, фосфор, сера, калий) составляет 96 %. Среди микроэлементов основными являются хлор, цинк, натрий. Известно, что микроэлементы принимают участие в окислительно-восстановительных процессах, оказывают влияние на синтез белков, углеводов и прочих соединений. Микроэлементы повышают устойчивость растений к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также к бактериальным и грибковым

Таблица 3.5 – Содержание минеральных веществ в водном экстракте зеленых листьев

Наименование	Содержание, мг/кг	Наименование	Содержание, мг/кг
Натрий	1,3	Хром	0,05
Магний	21,3	Марганец	0,6
Фосфор	11,3	Кобальт	0,009
Сера	894,3	Медь	0,1
Хлор	<31,1	Цинк	1,9
Калий	128	Селен	<0,06
Кальций	<2,6	Бром	<0,06
Железо	0,5	Бор	0,5
Алюминий	0,05	Стронций	0,3
Кремний	0,2	Молибден	0,01
Свинец	0,0002	Йод	0,3
Никель	0,009	Мышьяк	<0,003
Ртуть	0,001	Кадмий	0,002

болезням. Например, марганец, молибден, медь и бор оказывают положительное влияние на фотосинтез, способны ускорить развитие растений и созревания семян [209].

Таким образом, водный экстракт содержит необходимые органические и минеральные компоненты, способствующие росту растений, и может быть использован в качестве ростостимулирующих веществ, например, при проращивании семян злаковых и хвойных культур, а также для зрелых растений. Кроме того, компоненты, содержащиеся в водном экстракте, могут являться основой для питания микроорганизмов.

3.3 Исследование состава липидов и каротиноидов спиртовых экстрактов листьев тополя

Исследования по выделению липидов из листьев тополя, проведенные по методике п.2.2.1, показали, что зеленые листья на 4 %, а опавшие на 2,5 % а.с.с. состоят из этих компонентов. Липиды являются важнейшей группой биомолекул, которая влияет на качество кормовых продуктов, а также может служить дополнительным источником углерода при культивировании микроорганизмов. Например, содержание липидов в листьях трав составляет 5-10 %, в траве культурных злаковых пастбищ – 5-6 %, бобово-злаковых – 4-5 % а.с.с. [210].

Исследование группового состава липидов показало, что содержание нейтральных липидов в зеленых и опавших листьях тополя составляет 53 и 67 %, гликолипидов – 35 и 25 % и фосфолипидов – 12 и 9 % соответственно. Поскольку сведения о липидах в опавших листья отсутствуют, для выделенных групп были сняты ИК-спектры (рисунок 3.1).

Установлено, что в ИК-спектрах липидов опавших листьев наблюдаются полосы поглощения (п. п.), относящиеся к определенным структурным группам. Так широкая п. п. с максимумом при 3450 см^{-1} обусловлена валентными колебаниями связанной воды и различными типами ОН-групп [211]. Интенсивные п. п. при 2956 и 2920 см^{-1} обусловлены валентными колебаниями алифатических CH_3 - и CH_2 -групп. Поглощение в области $1550\text{--}700\text{ см}^{-1}$ характерно для деформационных колебаний связи С-Н и колебаний скелета, таких как $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-(\text{CH}_2)_4-$ и др.

Как известно из литературы, наличие сопряженных связей $\text{C}=\text{C}$ приводит к появлению двух и более п. п. в области $1650\text{--}1600\text{ см}^{-1}$, причем с увеличением числа сопряженных связей п. п. смещаются в сторону меньших частот.

Наиболее интенсивное поглощение в этой области наблюдается в ИК-спектре гликолипидов [211-214].

В групповом составе липидов опавших листьев большая доля приходится на нейтральные соединения. Методом тонкослойной хроматографии установлено в составе нейтральных липидов опавших листьев присутствие свободных жирных кислот ($R_f - 0,15$), триацилглицеридов ($R_f - 0,33$) и углеводов ($R_f - 0,95$).

Каротиноиды – это биологически активные вещества, представляющие собой производные изопрена. Классифицируют на две подгруппы: каротины – углеводородные производные изопрена (ζ -каротин, нейроспорин, ликопин, β -каротин, γ -каротин, δ -каротин, α -каротин и др.) и ксантофиллы – кислородсодержащие производные каротинов (лютеин, зеаксантин, астаксантин и др.) [215]. Установлено, что содержание каротиноидов в опавших листьях составляет 0,22 %, что в два раза выше, чем в зеленых листьях.

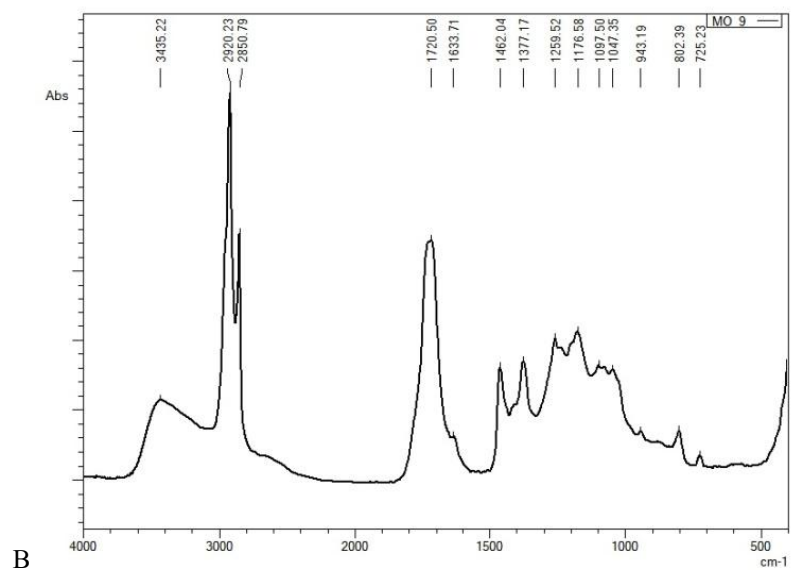
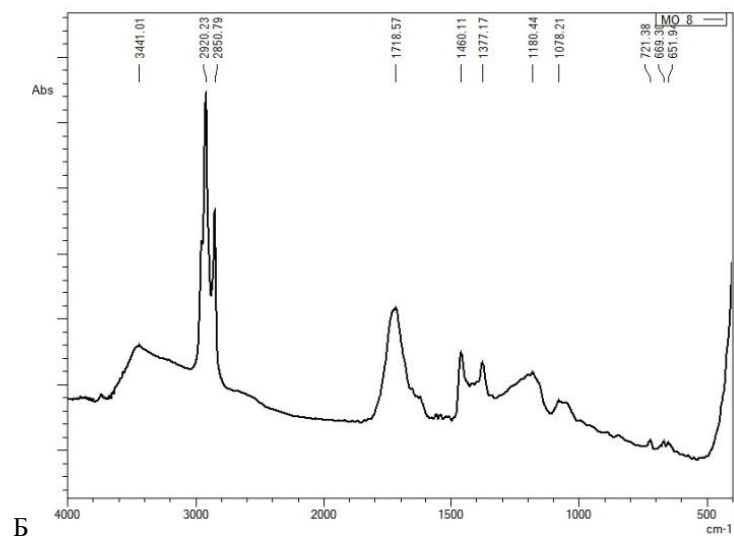
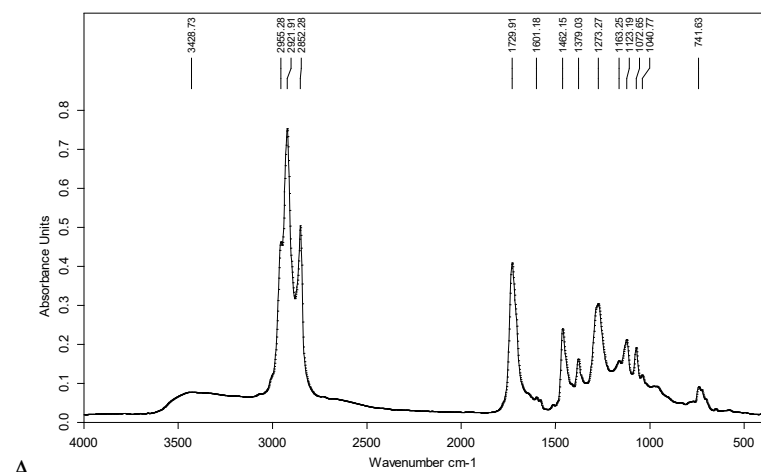


Рисунок 3.1 – ИК-спектры нейтральных липидов (А), гликолипидов (Б), фосфолипидов (В)

Качественный анализ функционально-группового состава каротиноидов опавших листьев представлен на рисунке 3.2.

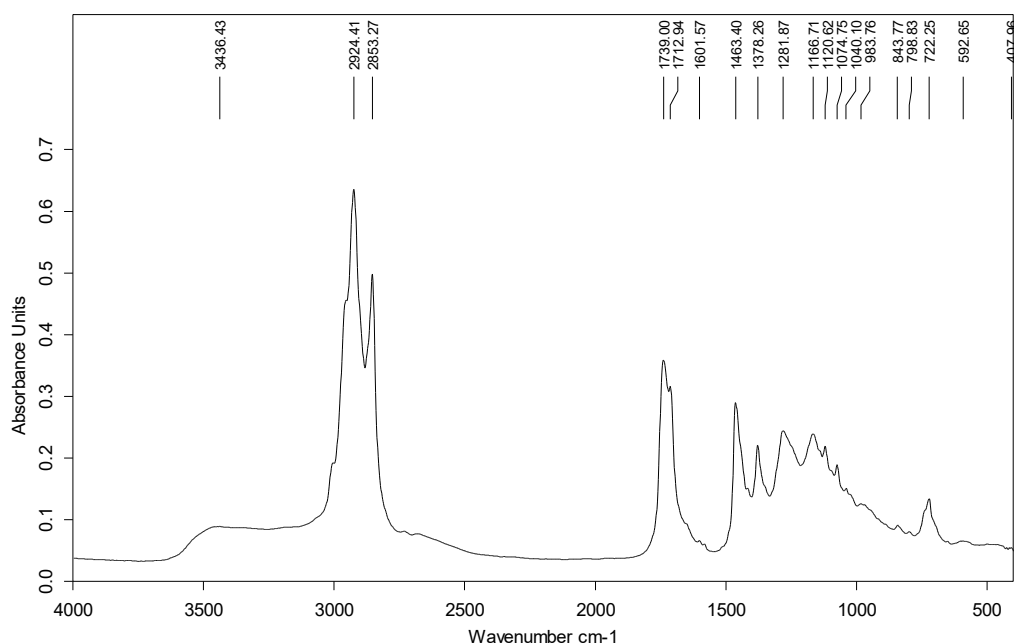


Рисунок 3.2 – ИК-спектр каротиноидов опада

Установлено, что в каротиноидах присутствуют вещества с ОН-группами (п.п. при 3436 см^{-1}) и С=О связями альдегидов и сложных эфиров (п.п. при 1740 см^{-1}) [211]. Полоса поглощения при 1713 см^{-1} свидетельствуют о валентных колебаниях карбонильной группы кетонов или С=О группы непредельных карбоновых кислот (-C=C-COOH). Полоса поглощения при 1282 см^{-1} характеризуется валентным колебанием связи С-О [213]. Интенсивные п.п. при 2924 и 2852 см^{-1} обусловлены валентными колебаниями алифатических CH_3 - и CH_2 -групп, $1550\text{-}700\text{ см}^{-1}$ - колебаниями связи С-Н и колебаниями скелета $\text{-C(CH}_3)_2$, $\text{-(CH}_2)_4$ - и др. Появление п.п. в области $1690\text{-}1635\text{ см}^{-1}$ подтверждает наличие связей С=С, сопряжение с другими связями С=С частота понижается (1601 см^{-1}) [211-214].

Результаты качественного анализа каротиноидов листьев тополя методом тонкослойной хроматографии в системе петролейный эфир-этанол (16:1) показали наличие ксантофиллов ($R_f - 0,6$) и каротина ($R_f - 0,98$) в исследуемой пробе.

3.4 Результаты исследования группового состава спиртовых экстрактов листьев тополя

Фракционирование веществ, содержащихся в спиртовых экстрактах, осуществляли с помощью растворителей с возрастающей полярностью: петролейный эфир, диэтиловый эфир, этилацетат, бутанол. Результаты исследования зеленых (июль) и опавших (сентябрь) листьев приведены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Фракционный состав листьев тополя

Наименование экстракта	Содержание, %	
	зеленые листья	опад
Петролейный	1,2/11,1	1,2/15,0
Диэтиловый	0,1/3,8	0,4/12,2
Этилацетатный	4,9/46,7	4,8/59,5
Бутанольный	3,1/28,7	1,7/20,3
Примечание – в числителе приведено содержание от а.с.с., в знаменателе – от суммы экстрактивных веществ; относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %		

Результаты исследования фракционного состава листьев, отобранных в июне и августе, представлены в работе [75], фракционный состав опавших листьев ранее не изучался.

Полученные результаты свидетельствуют, что наибольшее количество веществ из этанольного экстракта зеленых (июль) и опавших листьев (сентябрь) тополя извлекается этилацетатом (47 и 60 % соответственно). Известно, что в этилацетат могут переходить флавоноиды [216, 217], содержание этих веществ в листьях тополя сибирского региона выше, чем, например, в зеленых листьях тополя бальзамического (в 1,7 раз) и дельтовидного (в 2,3 раза), произрастающих в Самарской области [79]. Содержание данной группы веществ в листьях тополя к концу вегетативного периода снижается [75]. Бутанолом извлекаются гликозиды фенольных соединений, ацетилированных фенолокислотами, уксусной кислотой или метоксилированными по углеводной части [217]. На долю этих веществ в зеленых листьях (июнь-август) приходится 3-6 % а.с.с. [75], в опаде (сентябрь) – 2 % а.с.с.

Качественный анализ функционально-группового состава экстрактов зеле-

ных (июль) и опавших (сентябрь) листьев проведен методом ИК-спектро- скопии на приборе ИК-Фурье. Установлено, что ИК-спектры отдельных фракций экстрактов зеленых и опавших листьев имеют одинаковый профиль (рисунок А.1, А.2). На рисунке 3.3. представлен ИК-спектр петролейного экстракта зеленых листьев тополя.

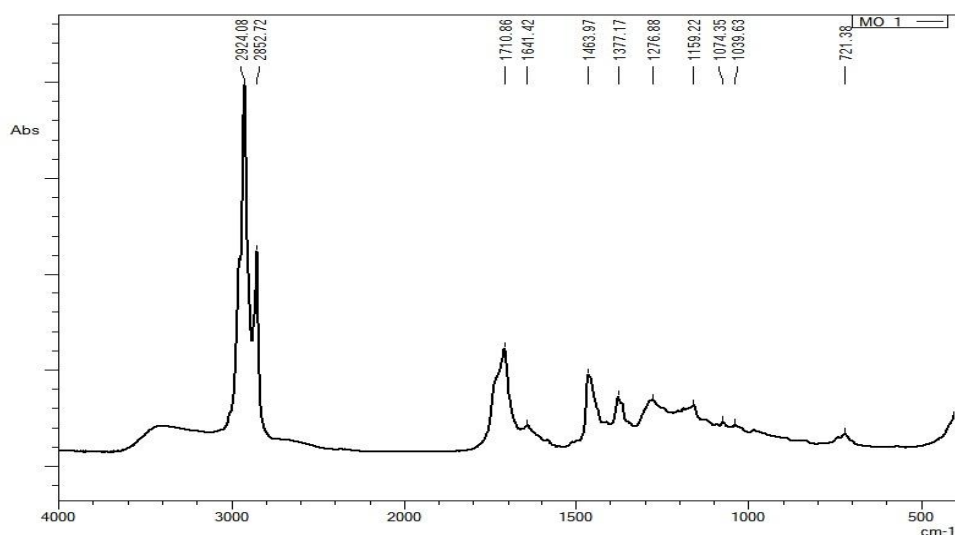


Рисунок 3.3 – ИК-спектры петролейного экстракта зеленых листьев

Установлено, что в экстрактах присутствуют соединения с наличием различных типов ОН-групп, С=О связи альдегидов, карбонильной группы кетонов или С=О группы непредельных карбоновых кислот ($-\text{C}=\text{C}-\text{COOH}$) (петролейный и диэтиловый экстракты зеленых и опавших листьев) [211-213].

Полосы поглощение в области $1650\text{-}1600\text{ см}^{-1}$ в ИК-спектрах свидетельствуют о наличие сопряженных связей $\text{C}=\text{C}$. Наличие этих связей обусловлено присутствием в листьях, например, флавоноидов [79]. Известно, что ряд флавоноидов обладает противомикробным действием.

Во всех экстрактах обнаружены интенсивные полосы поглощения при 2920 , 2930 см^{-1} это характерно для валентных колебаний алифатических CH_3 - и CH_2 -групп. Для деформационных колебаний связи $\text{C}-\text{H}$ и колебаний скелета (например, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$, $-(\text{CH}_2)_4$ - и др.) характерны поглощения в области $1550\text{-}700\text{ см}^{-1}$.

О том, что в состав диэтилового экстракта входят непредельные карбоновые

кислоты, на наш взгляд, может свидетельствовать наличие п. п. при 1278 см^{-1} , характеризующая валентные колебания связи C-O [211-213].

3.4.1 Результаты исследования компонентного состава фракций

Исследование компонентного состава фракций спиртовых экстрактов изучали на примере зеленых (месяц отбора: июнь, июль, август) и опавших листьев (сентябрь).

Состав компонентов экстрактов изучали методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Анализ проводили на хромато-масс-спектрометре «Agilent 5975C-7890A». Методика ГХ-МС- анализа описана в подразделе 2.2.1.

На рисунке 3.4 представлена хроматограмма петролейного экстракта зеленых листьев тополя (на примере проб, отобранных в августе).

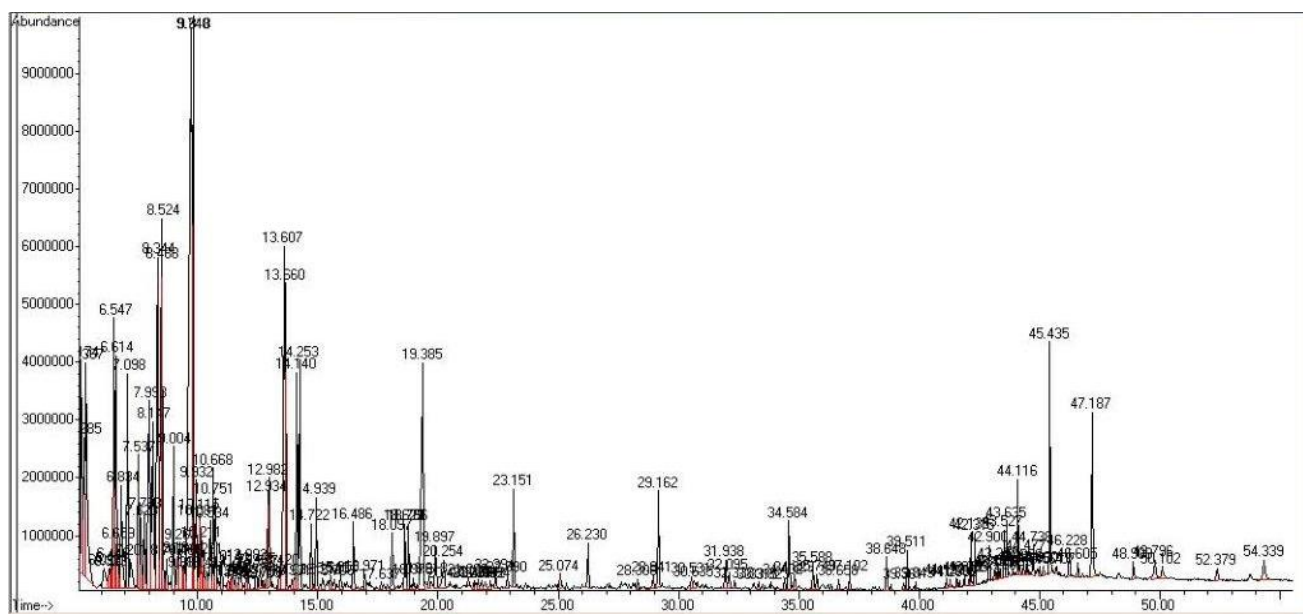


Рисунок 3.4 – Хроматограмма веществ петролейного экстракта
зеленых листьев тополя (август)

В результате исследования петролейных экстрактов (ПЭ) листьев разных фаз развития было идентифицировано 118 (июнь), 169 (июль), 144 (август) и 105 (сентябрь) компонентов, диэтиловых экстрактов (ДЭ) – 57 (июнь), 19 (июль), 95

(август) и 55 (сентябрь) компонентов, этилацетатных экстрактов (ЭА) – 86 (июнь), 96 (июль), 107 (август) и 51 (сентябрь) компонентов.

В таблице 3.7 приведен компонентный состав веществ листьев тополя (август), растворимых в петролейном эфире. Компонентный состав других фракций спиртовых экстрактов листьев тополя представлен в таблицах А.1-А.11.

Таблица 3.7 – Состав компонентов листьев тополя, растворимых в петролейном эфире

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
1	2	3
5.174	2,3-диметилгептан	2,328
5.285	4-этилгептан	1,424
5.367	4-метилоктан	3,433
6.098	9-гидрокси-2-нонанон	0,518
6.547	1-(3-фенилоксиранил)-этанон	2,774
6.614	1,1'-оксибисгексан	1,686
6.834	Бутилизогексиловый эфир щавелевой кислоты	1,238
7.098	2,2-диметилпентаналь	1,744
7.201	Транс-2,3-эпоксидекан	0,589
7.537	4,5-диметилоктан	1,381
7.623	3-метил-бутиладоксим	0,652
7.793	1-(3-бутилоксиранил)-этанон	0,873
7.993	3,4 -диметилоктан	2,925
8.147	5-метил-нонан	2,351
8.344	1-метилэтиловый эфир пропановой кислоты	4,313
8.488, 8.524	Циклогексилгексиловый эфир щавелевой кислоты	5,655
9.004	2,2-диметил-пропановая кислота	1,118
9.263	1-гептадеканол (гептадециловый спирт)	0,910
9.740	4-гидрокси-3-гексиловый эфир пропионовой кислоты	11,965
9.818	2-метил-1,3-пропандиол	6,142
9.932	2,2,5,5-тетраметил-3-гексанон	0,960
10.081	2,6-диметил-2-гептанол	0,521
10.115	3-гексанон	0,668
10.534	2-нонанон	0,723
10.668	2,2,4,4,6,8,8-гептаметилнонан	1,045
10.751	4-метил-2-гептанон	0,684
12.982, 13.660	4,5-диэтилоктан	3,208
14.140, 14.253	5,6-диэтилдекан	3,838
14.722	4-этилдекан	0,560
14.939	5-метилундекан	0,764
16.486	Додекан (дигексил, бигексил)	0,559
18.629, 18.766	Z-1-метокси-2-пентен	1,119
19.385	1,1-диметокси-додекан (диметилацеталь лауральдегида)	3,942

1	2	3
29.162	Гексадекан (цетан)	0,818
34.584	Октадекан	0,594
42,315	3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол (фитол)	0,223
45.435, 47.187	Эйкозан	2,760
Итого идентифицировано		77,005

Установлено, что в составе петролейных экстрактов от 31 до 99 % приходится на долю кислородсодержащих соединений от суммы идентифицированных веществ (рисунок 3.5).

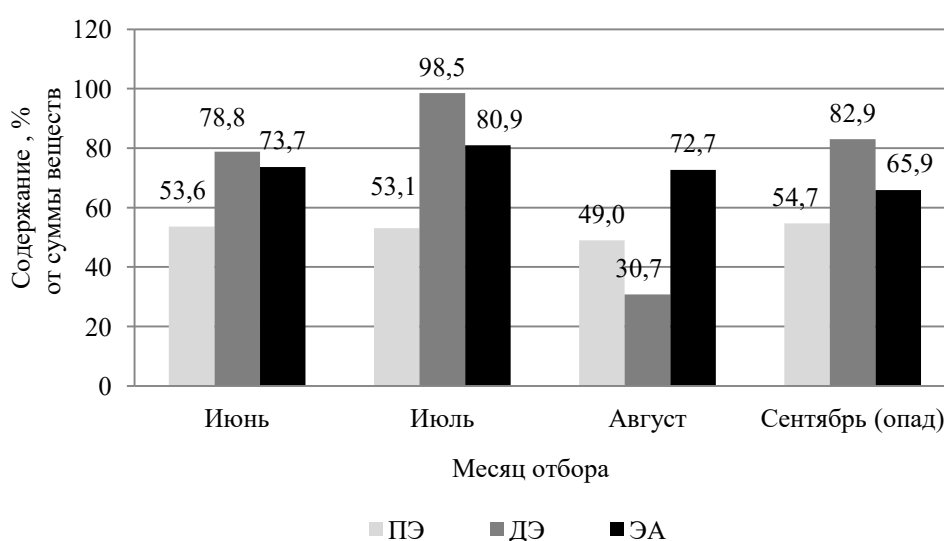


Рисунок 3.5 – Динамика содержания кислородсодержащих веществ в листьях тополя

Известно, что петролейный эфир извлекает терпеноиды, н-алканы, жирные кислоты, зеленые пигменты и другие вещества. Основными кислородсодержащими соединениями экстрактов листьев, отобранных в июне, августе и сентябре, являются эфиры кислот (июнь – 37,7, август – 47,3 и сентябрь – 54,5 %), а в июле – кетоны (37,7 % от суммы кислородсодержащих веществ).

Также были обнаружены соединения, содержащие в своем составе кремний (рисунок 3.6).

Известно, что кремний является обязательным элементом тканей растений, он обладает рядом биологических свойств, одним из которых является подавление роста болезнетворных микроорганизмов. Сопротивляемость растений к пора-

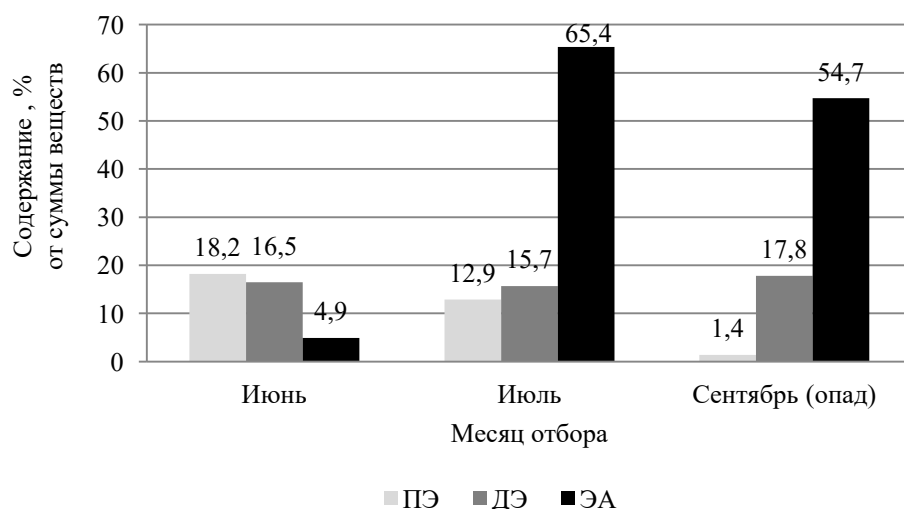


Рисунок 3.6 – Динамика содержания кремнийсодержащих веществ в листьях тополя

жению различными вредителями увеличивается с увеличением содержания в них кремния [218].

Среди не содержащих кислород соединений в петролейном экстракте обнаружены углеводороды от C_{20} и выше, количество которых составляет: в июне – 57,6 %, июле – 62,8 %, августе – 9,8 %, сентябре – 63,4 % от суммы углеводородов), среди них основным являются эйкозаны. Также в петролейных экстрактах обнаружены бром-, фтор-, серо-, и азотсодержащие соединения.

Следует отметить, что в экстрактах листьев, как зеленых, так и опавших обнаружен 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадец-1-ол (фитол). Фитол является одним из основных спиртов дитерпенов ациклических, входит в состав хлорофилла и является предшественником витаминов Е и К. Из литературы известно, что фитол обладает анксиолитическим (антифобическим), модулирующим метаболизм, цитотоксическим, антиоксидантным, индуцирующим аутофагию и апоптоз, антиноцицептивным, противовоспалительным, иммуномодулирующим и антимикробным действием [219].

В петролейном экстракте зеленых листьев, отобранных в июле, обнаружены такие вещества как ацетат мегастерола (1,4 %) и γ -ситостерин (5,1); в сентябре – 22,2-дигидростигмастерол (ситостерол) (8,2 % от суммы идентифицированных). Мегестрола ацетат, продается под маркой Megace, это гестагенный препарат, используется для лечения рака молочной железы и эндометрия [220-222]. Ситосте-

рол – растительный стерин, по химической структуре напоминающий холестерин. γ -Ситостерин – это важный растительный стерол, является биологически активным соединением. В работах [223, 224] показана возможность его использования в качестве компонента противораковых препаратов, а также для снижения уровня холестерина в крови.

Известно, что диэтиловым эфиром извлекаются сложные эфиры и спирты, частично гликолипиды и фенольные соединения. В диэтиловом экстракте зеленых листьев (июль) обнаружена значительная доля спиртов: 3-гексанол и 2,4-диметил-2,4-пентандиол (в сумме 77,8 %), в других экстрактах (август и сентябрь) доля спиртов составляет 30,8 и 34,3 % соответственно от суммы кислородсодержащих соединений (см. таблицы А.4-А.7). В составе экстрактов листьев (июнь) значительная доля приходится на 1-этил-бутилгидропероксид (16,8 %) и 2-метил-3-пропил-цис-оксиран (30,5 % от суммы кислородсодержащих соединений).

Кроме кремнийсодержащих соединений в диэтиловых экстрактах присутствуют вещества, содержащие бром и азот.

В диэтиловых экстрактах листьев обнаружен этилен брассилат (июль и август) и 1,3,4,6,7,8-гексагидро-4,6,6,7,8,8-гексаметил-циклопента[g]-2-бензо-пиран (июнь), которые характеризуется сильным и устойчивым мускусным запахом и применяются в парфюмерии.

В диэтиловом экстракте опавших листьев установлено наличие диэтилтолуамида, соединения, обладающего репеллентным и инсектицидным действием [225]

Среди не содержащих кислород компонентов основными являются короткоцепочечные углеводороды (C_{15} и ниже), исключение составляет диэтиловый экстракт листьев, отобранных в июне, там обнаружен 3-метилгенэйкозан (32,1 % от суммы углеводородов).

В этилацетатном экстракте зеленых листьев обнаружено высокое содержание кислот (кетоновая и 2-бутеновая (Е)-кислоты), которое составляет 28,5 % (июнь) и 58,42 % (август) от суммы кислородсодержащих соединений (см. таблицы А.8-А.11).

Среди кислородсодержащих соединений установлено наличие галаксоида (полициклическое мускусное соединение) – 19,9 % (июнь) и этилен брассилата – 8,38 % (август). Кроме того, в экстракте (август) обнаружены гедион (3-оксо-2-пентенилциклопентануксусной кислоты метиловый эфир) и β -изо-метилюнон, которые также применяют в отдушках и парфюмерных композициях [226].

Кроме кислородсодержащих соединений в этилацетатных экстрактах присутствуют серо-, азот, фосфор- и хлор- (июнь) содержащие соединения.

В этилацетатных экстрактах (июль и сентябрь) значительная доля кислородсодержащих соединений приходится на гексаметилциклотрисилоксан, декаметилтетрасилоксан и 3,5-бис-триметилсилил-2,4,6-циклогептатриен-1-он (68 и 61 % от суммы кислородсодержащих веществ соответственно). В июньском экстракте обнаружен 4-метокси-3-нитробифенил, используемый в качестве важного промежуточного звена в синтезе бифеназата, который признан эффективным бактерицидом [227].

Таким образом, в процессе исследования спиртовых экстрактов обнаружены биологически активные вещества, на основе которых могут быть получены лекарственные формы, а также компоненты, способные подавлять рост и развитие микроорганизмов.

3.5 Микробиологическая переработка вегетативной части тополя

Для микробиологической конверсии использовали различные растительные субстраты на основе зеленых (июнь) и опавших (сентябрь) листьев тополя:

субстрат 1 - опавшие листья тополя;

субстрат 2 - зеленые листья;

субстрат 3 - твердый остаток зеленых листьев после спиртовой экстракции;

субстрат 4 - твердый остаток зеленых листьев после спиртовой и водной экстракции;

субстрат 5 - твердый остаток зеленых листьев после водной экстракции.

3.5.1 Результаты культивирования базидиомицетов на листьях тополя

Грибы рода Fp5-15 *Fomitopsis pinicola* и PP-3.2 *Pleurotus pulmonarius* осуществляют биодеструкцию различных древесных пород при помощи комплексов целлюлозо- и лигнолитических ферментов [196]. По мере роста оценивали ростовые параметры культуры (диаметр, плотность колонии и высота мицелия) [196]. Результаты определения радиальной скорости (РС) роста грибов представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Скорость роста грибов на растительных субстратах

В миллиметрах в сутки

Номер субстрата	Штамм	Продолжительность культивирования, сут				
		4	6	8	10	X _{ср.}
1	Fp5-15	2,9	3,5	4,3	4,2	3,7±0,66
	PP-3.2	2,8	3,6	4,1	4,2	3,7±0,64
2	Fp5-15	2,1	3,7	4,5	4,3	3,7±1,09
	PP-3.2	3,1	5,0	4,4	4,3	4,2±0,79
3	Fp5-15	2,1	3,9	4,8	4,2	3,8±1,16
	PP-3.2	3,1	5,0	4,5	4,2	4,2±0,80
4	Fp5-15	1,3	4,3	4,3	4,2	3,5±1,48
	PP-3.2	3,6	5,9	5,3	-*	4,9±1,19
5	Fp5-15	2,3	3,4	3,9	4,2	3,5±0,83
	PP-3.2	3,9	6,2	5,3	-	5,1±1,16

Примечание – относительная стандартная ошибка опыта на 4-е, 6-е, 8-е, 10-е сутки не превышает 5 %;
* – остановка роста за счет полного обрастания субстрата;

Установлено, что грибы имеют разную радиальную скорость роста. С максимальной скоростью гриб Fp5-15 *F. pinicola* растет на послеэкстракционном остатке (п.э.о.) зеленых листьев (субстрат 3), чашка Петри зарастала уже на 10-е сутки. На других субстратах низкая скорость роста гриба, вероятно, связано с присутствием в субстрате терпеновых соединений и флавоноидов в составе листьев, сдерживающих рост микроорганизмов.

Для гриба PP-3.2 *P. pulmonarius* максимальная радиальная скорость роста отмечена на субстратах 4 и 5. В процессе культивирования субстраты полностью обрастали мицелием на 8-е сутки культивирования.

Не менее важным ростовым показателем является ростовой коэффициент

(РК), который свидетельствует об адаптации штамма к конкретному субстрату (таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Ростовый коэффициент грибов

Номер субстрата	Штамм	Продолжительность культивирования, сут				
		4	6	8	10	X _{ср.}
1	Fp5-15	11,9	13,8	17,3	16,8	14,9±2,55
	PP-3.2	22,8	28,5	32,6	33,5	29,4±4,87
2	Fp5-15	12,5	29,5	36,1	34,0	28,0±10,7
	PP-3.2	37,5	60,5	52,3	51,0	50,3±9,52
3	Fp5-15	17,0	31,2	38,0	33,6	29,9±9,08
	PP-3.2	37,1	60,3	53,6	50,4	50,4±9,75
4	Fp5-15	2,5	8,5	8,5	7,6	6,8±2,88
	PP-3.2	7,1	11,9	10,5	7,6	9,3±2,30
5	Fp5-15	4,6	6,8	7,9	7,7	6,8±1,51
	PP-3.2	7,9	12,4	10,5	7,6	9,6±2,28

Примечание – относительная стандартная ошибка опыта на 4-е, 6-е, 8-е, 10-е сутки не превышает 5 %

Установлено, что исследуемые штаммы относятся к медленно растущим колониям базидиальных грибов ($РК < 50$), согласно классификации А.С. Бухало [196].

Ростовой коэффициент грибов PP-3.2 *P. pulmonarius* выше, чем Fp5-15 *F. pinicola*, эта закономерность наблюдается при культивировании грибов на всех растительных субстратах. Высокий ростовой коэффициент отмечен при культивировании грибов на субстратах 2 и 3.

Характер формирования воздушного мицелия в зависимости от растительного субстрата проявлялся не одинаково. На всех субстратах грибы формировали белый ватный мицелий с разной плотностью, ровными краями и без четко выраженной зональности. Штамм PP-3.2 *P. pulmonarius* образовывал мицелий, с характерным приятным грибным запахом. Морфология колоний, используемых выше грибов для микробиологической переработки растительных субстратов приведена на рисунке 3.7.

Об эффективности воздействия ферментативного комплекса используемых грибов на субстрат судили по убыли массы в процессе биодеструкции (рисунок 3.8).

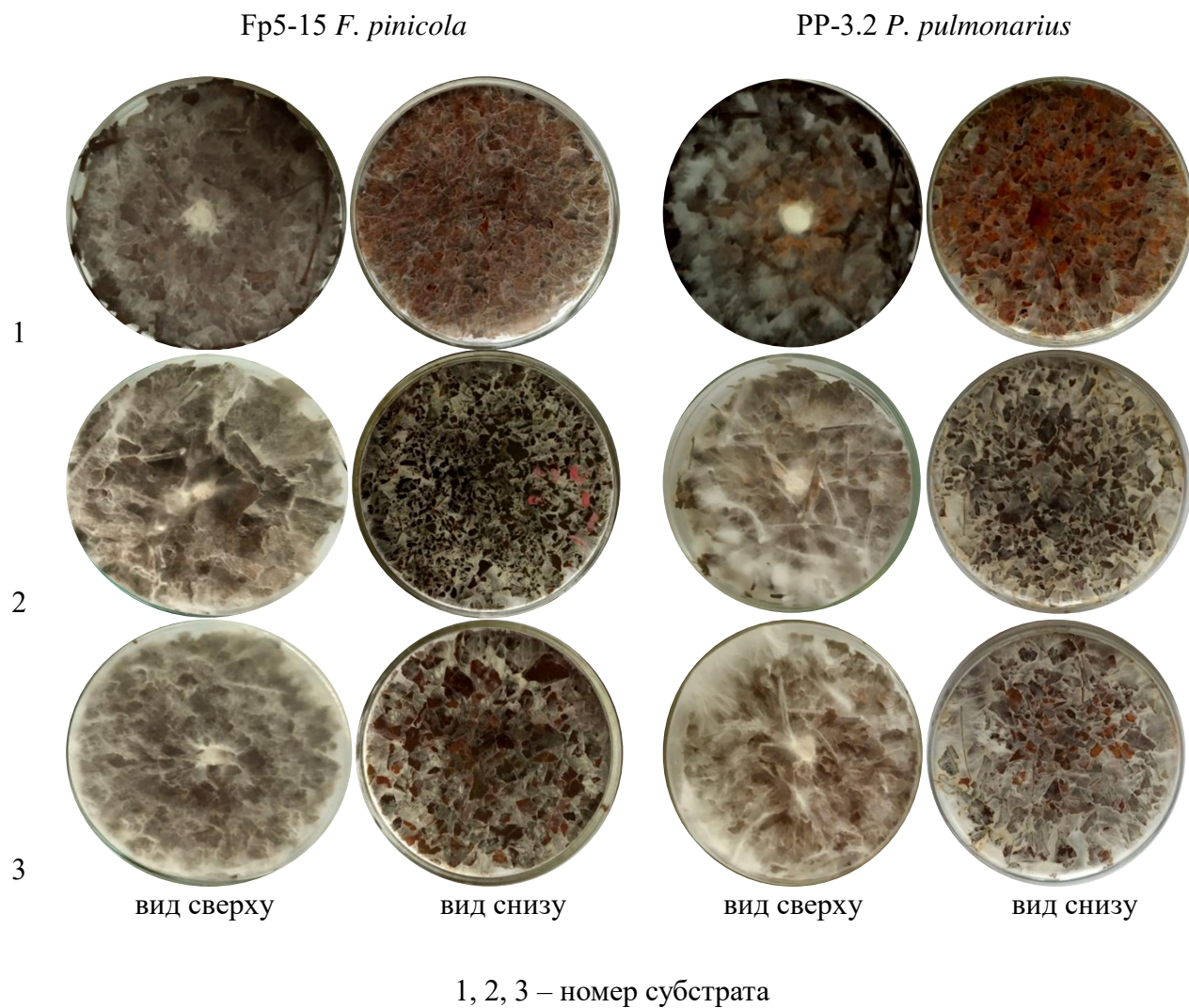


Рисунок 3.7 – Морфология колоний грибов на субстратах из листьев тополя на 10-е сутки культивирования

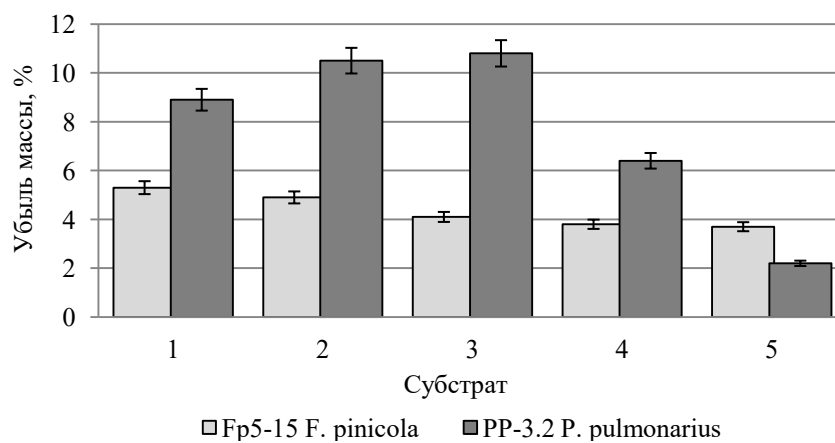


Рисунок 3.8 – Убыль массы субстратов при культивировании грибов

Установлено, что максимальная субстратразрушающая активность РР-3.2 *P. pulmonarius* при твердофазной ферментации растительных отходов отмечена на субстратах 2 и 3, убыль массы составила 10,5 и 10,8 % соответственно. Гриб Fr5-15 *F. pinicola* в большей степени разрушает опад, убыль массы субстрата составила 5,3 %.

Таким образом, проведенные исследования показали, что данные грибы способны колонизировать различные субстраты, состоящие из листьев тополя, однако радиальная скорость роста и ростовой коэффициент различаются. Наиболее благоприятными для твердофазного культивирования грибов являются субстраты 1 (опад) и 3 (твердый остаток листьев после спиртовой экстракции).

Использование непосредственно зеленых листьев для биоконверсии неэкономично. Необходимо предварительно из биомассы удалять экстрактивные вещества, которые имеют самостоятельное применение, а для биоконверсии использовать твердый послеэкстракционный остаток.

3.5.2 Биотрансформация субстратов под действием грибов *F. pinicola* и *P. pulmonarius* на основе листьев тополя

Для исследования биотрансформации компонентов в процессе культивирования грибов нами были выбраны наиболее благоприятные для их роста субстраты на основе листьев тополя. Для сравнения химического состава исходных субстратов производили пересчет полученных данных с учетом коэффициента убыли массы для каждого образца в процессе культивирования гриба. Количество каждого компонента, входящего в состав субстрата, рассчитано на единицу абсолютно сухого остатка. Результаты исследования компонентного состава субстрата после биодеструкции приведены в таблице 3.10.

Полученные данные свидетельствуют о том, что культивирование грибов приводит к изменению содержания всех компонентов исследованных субстратов, причем их биоконверсия протекает по-разному. При культивировании грибов на опаде (субстрат 1) и зеленых листьях (субстрат 2) наиболее полно утилизируются

Таблица 3.10 – Компонентный состав субстратов до и после биодеструкции

Компонент	Штамм	Содержание до и после биодеструкции, % а.с.с.					
		субстрат 1		субстрат 2		субстрат 3	
		до	после	до	после	до	после
Вещества, экстрагируемые горячей водой	Fp5-15	29,2	13,6	26,7	11,7	24,4	16,1
	PP-3.2		16,2		14,8		17,0
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	Fp5-15	4,9	5,0	29,2	20,2	9,0	7,2
	PP-3.2		3,0		19,4		6,4
Легкогидролизуемые полисахариды	Fp5-15	17,4	13,8	11,1	8,7	8,7	6,6
	PP-3.2		11,2		7,9		6,3
Трудногидролизуемые полисахариды	Fp5-15	15,5	14,9	12,3	9,6	21,5	15,1
	PP-3.2		15,2		10,2		17,1
Лигниновые вещества	Fp5-15	20,3	18,9	13,7	14,0	25,2	22,1
	PP-3.2		18,4		13,6		20,8
Минеральные вещества	Fp5-15	9,6	10,6	7,0	6,6	11,2	9,6
	PP-3.2		9,4		6,8		9,7
Примечание – относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %							

водоэкстрактивные вещества, где источники углерода и азота находятся в доступной форме, содержание этих веществ в процессе культивирования снижается на 45-56 %. Грибы также утилизируют полисахариды, в зависимости от биодеструктора их количество снижается на 12 и 20 % (субстрат 1), 22-23 % (субстрат 2), 28 и 23 % (субстрат 3). При этом грибы используют преимущественно гемицеллюлозы, в процессе деструкции их содержание уменьшается на 20-36 % (субстрат 1), 22-29 % (субстрат 2), 24-28 % (субстрат 3) для Fp5-15 *F. pinicola* и PP-3.2 *P. pulmonarius* соответственно.

Известно, что целлюлоза – это аморфно-кристаллический полимер. Поэтому для полного анализа возможности использования целлюлозы грибами в процессе деструкции растительных отходов была определена ее степень кристалличности (по методике, изложенной в п. 2.2). Содержание целлюлозы в субстратах 1 и 3 до и после биоконверсии (п/б) представлены на рисунке 3.9.

Установлено, что в процессе биоконверсии происходит снижение содержания целлюлозы, в большей степени под действием грибов Fp5-15 *F. pinicola*. Степень кристалличности – это относительное содержание кристаллической части в целлюлозе. Полученные рентгенограммы (зависимость интенсивности рассеянных образцом рентгеновских волн от угла между первичным пучком и направле-

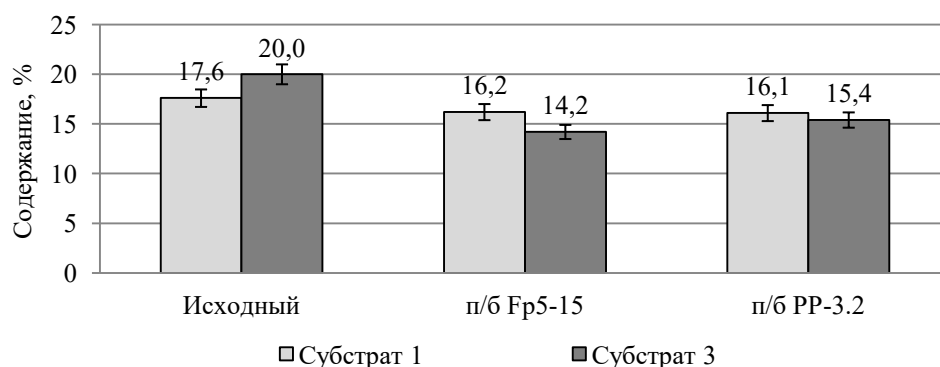


Рисунок 3.9 – Содержание целлюлозы в субстратах на основе листьев тополя до и после биоконверсии

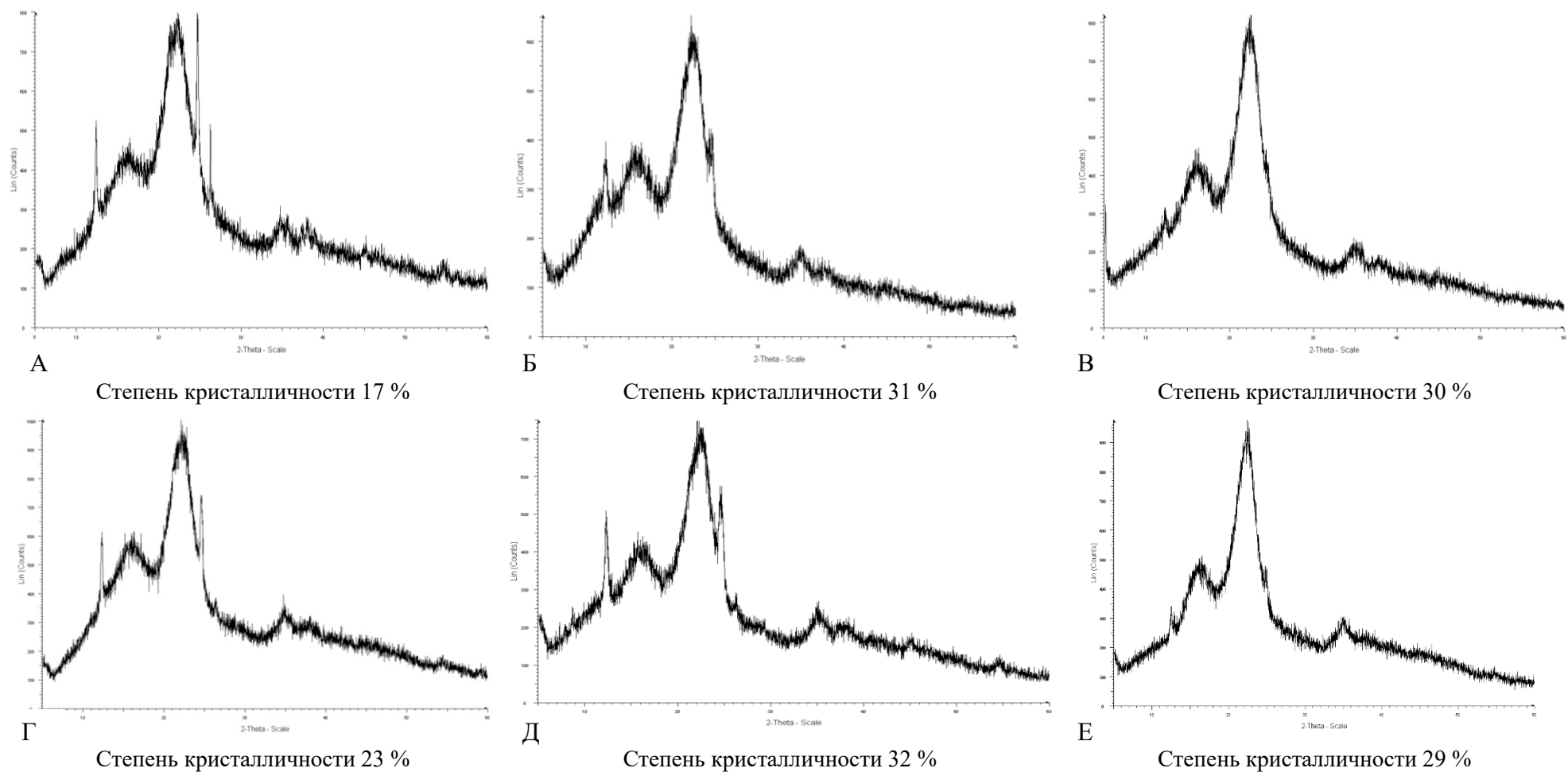
нием на детектор) представлены на рисунке 3.10.

Установлено, что в процессе биодеструкции происходит увеличение степени кристалличности целлюлозы. Это связано с тем, что в процессе деструкции субстратов грибы утилизируют аморфную часть целлюлозы, за счет чего в процессе биодеструкции содержание целлюлозы снижается от 1,5 (субстрат 1) до 6 % (субстрат 3), при этом происходит увеличение степени кристалличности целлюлозы с 17 до 30-31 % (субстрат 1) и с 23 до 29-32 % (субстрат 3) в зависимости от биодеструктора.

Установлено, что в процессе биоконверсии субстратов 1 и 3 грибы утилизируют лигнинные вещества, их содержание снижается на 7-9 % (субстрат 1), 12-17 % (субстрат 3) для Fr5-15 *F. pinicola* и PP-3.2 *P. pulmonarius* соответственно. Следует отметить, что при культивировании грибов на субстрате 2 значительных изменений содержания лигнинных веществ не происходит.

Для полного анализа изменения химического состава субстратов в процессе биоконверсии была проведена термогравиметрия (ТГ/ДТГ) образцов (см. рисунки Б.2-Б.4).

Методы термического анализа позволяют оценить влияние биоконверсии сырья на его физико-химические показатели по убыли массы на отдельных стадиях термической деструкции, температурным интервалам индивидуальных стадий, скорости термического разложения и величине тепловых эффектов в исследуемом температурном диапазоне.



А – опад до биодеструкции; Б – опад после биоконверсии (п/б) Fr5-15 *F. pinicola*; В – опад п/б PP-3.2 *P. pulmonarius*; Г – зеленый лист до биодеструкции; Д – п.э.о. листьев (субстрат 3) п/б Fr5-15 *F. pinicola*; Е – п.э.о. листьев (субстрат 3) п/б PP-3.2 *P. pulmonarius*

Рисунок 3.10 – Рентгенограмма целлюлозы субстратов до и после биоконверсии

На рисунке 3.11 представлены ТГ- и ДТГ-кривые термического разложения опада до и после биоконверсии.

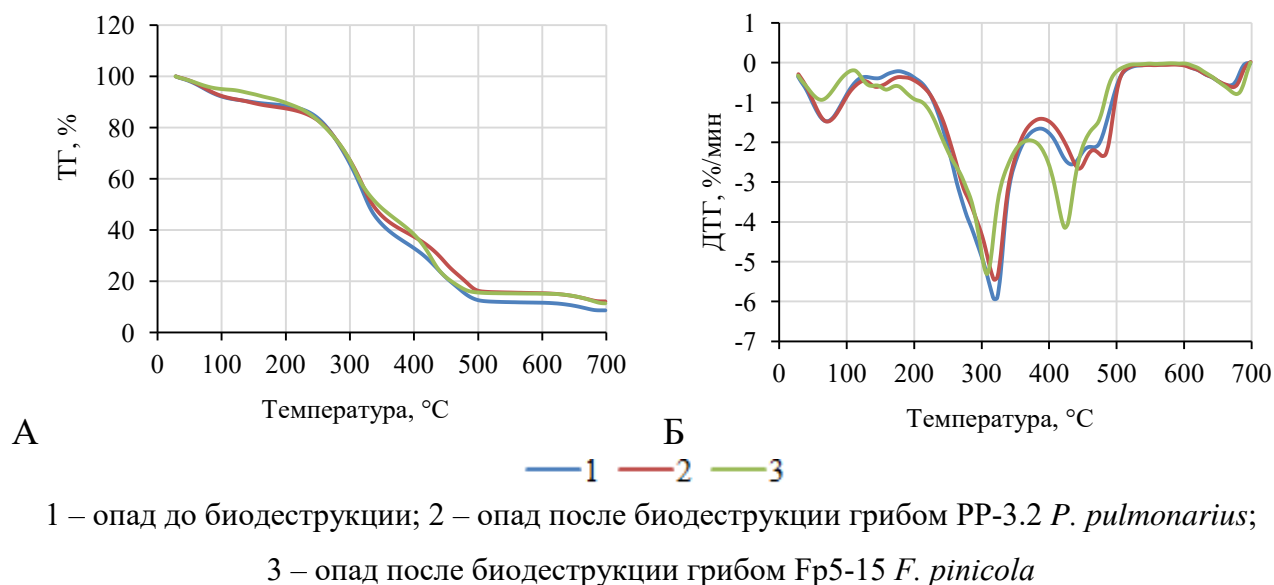
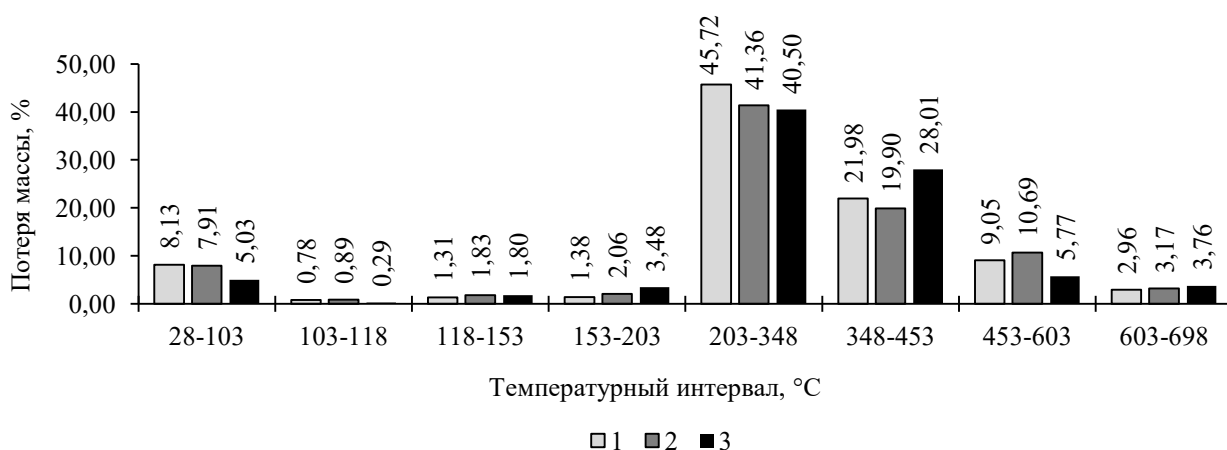


Рисунок 3.11 – ТГ- (А) и ДТГ-кривые (Б) термического разложения опада

Из результатов анализа следует, что микробиологическая переработка опада PP-3.2 *P. pulmonarius* не приводит к существенному изменению ширины и амплитуды пиков ДТГ (см. рисунки Б.5-Б.6). При биодеструкции грибом Fr5-15 *F. pinicola* происходит изменение амплитуды пика в диапазоне термического разложения углеводного и полифенольного комплексов.

Зависимость потери массы опада до и после биодеструкции от температуры представлена на рисунке 3.12.

На первом этапе нагревания образцов (28-103 °С) происходит их сушка и удаление легколетучих компонентов. Изменение массы образцов составляет 5-8 %. При дальнейшем повышении температуры до 348 °С наблюдается большая потеря массы, в этой области изменениям подвергаются полисахариды (олигосахариды, крахмал, целлюлоза, гемицеллюлоза) и частично лигнин. В температурном диапазоне от 348-453 до 513 °С завершается термическое разложение лигнина и происходит сгорание образовавшегося угля. В диапазоне 348-453 °С наибольшая потеря массы, зафиксированная у образца 3 опад после биодеструк-



1 – опад до биодеструкции; 2 – опад после биодеструкции грибом PP-3.2 *P. pulmonarius*;
3 – опад после биодеструкции грибом Fr5-15 *F. pinicola*

Рисунок 3.12 – Потери массы субстрата до и после биодеструкции

ции грибом Fr5-15 *F. pinicola*), что в 1,3 раза выше, чем у образца 1 (опад до биодеструкции).

Доля остаточной массы (зольные вещества и недоокисленный уголь) составляет 8,7 % (опад до биодеструкции), 12,2 и 11,4 % (опад после биоконверсии грибами PP-3.2 *P. pulmonarius* и Fr5-15 *F. pinicola* соответственно).

Таким образом, под действием ферментного комплекса использованных грибов PP-3.2 *P. pulmonarius* и Fr5-15 *F. pinicola*, микробиологической деструкции подвергалась как углеводная составляющая субстрата, так и лигнинные вещества. Установлено, что грибы подвергают изменениям аморфную часть целлюлозы, в процессе деструкции субстратов легкогидролизуемая составляющая полисахаридов снижается от 22 % (субстрат 2) до 36 % (субстрат 1). Снижение содержания лигнинных веществ наблюдается на субстрате 1 (до 9 %) и субстрате 3 (до 18 %). В процессе трансформации субстратов наиболее полно утилизируются водозэкстрактивные вещества от 30 % (субстрат 3) до 56 % (субстрат 2).

3.5.3 Характеристика белкового кормового продукта

При оценке пригодности продукта биодеструкции в качестве белкового корма важно наличие в нем не только протеина, но и нуклеиновых кислот, клетчатки,

витаминов, минеральных веществ, а также перевариваемость кормового продукта.

В таблице 3.11 представлены средние результаты определения содержания белка в исследуемых субстратах после культивирования грибов с использованием методик, изложенных в п. 2.2.3.

Таблица 3.11 – Содержание белка в субстратах до и после культивирования грибов

Субстрат	Содержание, % а.с.с.		
	исходный субстрат	субстрат после культивирования	
		Fp5-15 <i>F. pinicola</i>	PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>
Опад	9,4±0,54	18,3±0,45	28,1±0,49
Зеленый лист	12,3±0,59	25,1±0,72	30,2±0,65
Листья после спиртовой экстракции	13,1±0,62	22,9±0,65	25,8±0,64

Установлено, что после культивирования грибов на всех субстратах происходит увеличение содержания белка в продукте в 2-3 раза.

3.5.3.1 Аминокислотный состав белка кормового продукта

Известно, что одним из основных требований для сбалансированного кормления сельскохозяйственных животных и птицы является оценка качества сырья по аминокислотному составу. Аппетит животных напрямую зависит от аминокислотного состава кормов [228]. Аминокислоты необходимы для клеточного, липидного и углеводного обмена, а также для синтеза тканевых белков, гормонов, гемоглобина, витаминов и других важных соединений [229, 230]. В животноводческих хозяйствах, в особенности в птицеводческих и свиноводческих, для обогащения кормов используют синтетические аминокислоты, что увеличивает их стоимость [230].

Ниже приведен аминокислотный состав продуктов биоконверсии опавших листьев и твердого остатка зеленых листьев после спиртовой экстракции. Аминокислотный анализ белков продуктов биодеструкции был проведен на автоматическом анализаторе LA8080 Hitachi методом ВЭЖХ. Так, в белках субстратов на основе листьев было идентифицировано 17 аминокислот, в том числе семь незаменимых и две условно незаменимых (таблица 3.12).

Таблица 3.12 – Аминокислотный состав белка продуктов биоконверсии

Аминокислота	Содержание, мг/г сухой массы			
	опад (субстрат 1)		п.э.о. зеленых листьев (субстрат 3)	
	Fp5-15 <i>F. pinicola</i>	PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>	Fp5-15 <i>F. pinicola</i>	PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>
Треонин	3,04	2,12	9,17	10,52
Валин	3,99	3,23	12,83	12,41
Изолейцин	2,56	2,01	8,99	8,97
Лейцин	4,88	3,76	16,40	17,71
Фенилаланин	2,75	2,06	10,18	10,61
Лизин	1,89	1,25	7,48	6,78
Метионин	следы	следы	1,62	2,74
Гистидин	5,90	4,62	3,36	3,08
Аргинин	2,54	1,71	9,79	10,11
Цистин	следы	следы	0,64	следы
Аспарагиновая кислота	6,16	4,73	18,41	20,01
Серин	4,02	2,72	8,74	10,08
Глутаминовая кислота	6,80	5,51	24,73	26,87
Глицин	4,01	2,89	10,75	11,35
Аланин	3,70	2,80	11,36	12,33
Тирозин	1,80	следы	6,62	5,76
Пролин	2,62	2,00	9,15	9,51

Биологическая ценность биомассы грибов определялась по содержанию в ней незаменимых аминокислот. Современным стандартом качества пищевых и кормовых белков является показатель скорректированного аминокислотного коэффициента усвояемости белков – скор, и его перевариваемость, рекомендованные для применения при оценке качества белков Объединенным экспертным советом ФАО/ВОЗ. Скор – скорректированный аминокислотный коэффициент усвояемости белков (представляет собой процентное отношение определенной незаменимой аминокислоты в конкретном продукте к схожей аминокислоте в идеальном белке), рекомендованный для применения при оценке качества белков ФАО/WHO (1973).

Состав и скор незаменимых аминокислот белков продуктов, полученных в результате биодеструкции листьев грибами Fp5-15 *F. pinicola* и PP-3.2 *P. pulmonarius*, представлен в таблице 3.13. Для сравнения приведен аминокислотный состав эталонного белка – казеина.

Установлено, что доля незаменимых аминокислот в белке субстратов 1 и 3

после биодеструкции грибом Fp5-15 *F. pinicola* составляет 51 и 47 %, PP-3.2 *P. pulmonarius* – 50 и 87 % соответственно.

Продукт микробиологической конверсии опада грибами Fp5-15 *F. pinicola* соответствует показателю полноценности белка (кроме метионина с цистином). При использовании данного штамма для биоконверсии послеэкстракционного остатка листьев (субстрат 3) полученный продукт имеет высокий скор по валину (150,0) и фенилаланину с тирозином (165,0), при этом лимитирующей аминокислотой является лизин и метионин с цистином.

В белке продукта биоконверсии субстрата 3 грибом PP-3.2 *P. pulmonarius* наблюдается высокий скор (в 2,3-2,8 раз выше, чем в эталоне) практически по всем аминокислотам. В белке биодеструктированных опавших листьев также наблюдается высокий скор аминокислот (в 1,2-1,6 раз выше, чем в эталоне). Лимитирующими являются метионин с цистином.

Гистидин является для животных незаменимой аминокислотой, при декарбоксилировании образует гистамин, который понижает кровяное давление и стимулирует функции желез внешней секреции [231]. Установлено, что наибольшее его количество содержится в белке биодеструктированного опада и составляет 21 % при культивировании Fp5-15 *F. pinicola* и 22 % – PP-3.2 *P. pulmonarius* от суммы незаменимых аминокислот.

Сравнительный анализ незаменимых аминокислот белков продуктов биодеструкции субстратов показал, что они превосходят по лизину и треонину (в 2-4 раз), валину (в 1,7-3 раза), изолейцину (1,3-2,7 раз), лейцину (в 1,4-2,9 раза) и метионину (в 1,4-1,8 раз) содержание этих аминокислот в таких кормах, как пшеница, рожь, ячмень и др. [232].

Метионин и лизин – это одни из самых дефицитных для животных аминокислот. Метионин обладает липотропным действием, тем самым предохраняя животных от накопления жира в печени и ее жирового перерождения. Лизин входит в состав всех белков, но практически не участвует в реакциях переаминирования в отличие от других аминокислот. Дезаминирование лизина является необратимым процессом, поэтому важно, чтобы лизин непрерывно поступал в организм в

процессе пищеварения [231].

Отсутствие триптофана в исследуемых продуктах биоконверсии объясняется его неустойчивостью в условиях гидролиза минеральными кислотами, что является частью подготовки пробы для аминокислотного анализа.

В биодеструктированных субстратах 1 и 3 наблюдается высокое содержание аспаргиновой и глутаминовой кислот, на долю которых приходится от 25 % (субстрат 1) до 49 % (субстрат 3) от суммы аминокислот. Эти кислоты вместе с амидами составляют половину всего аминного азота тканей животных, а в нервной системе – 70 % всех аминокислот. Глутаминовая кислота также участвует в углеводно-жировом обмене и синтезе тканевых белков организма, а также в обезвреживании и выведении аммиака из организма [231]. В составе белков установлено высокое количество глицина, аланина, суммарное содержание которых составляет от 13 до 25 %. Аланин – улучшает работу мышц, предотвращает быстрое старение, повышает выносливость. Глицин – поддерживает здоровье костей и суставов, чувствительность к инсулину, отвечает за работу центральной нервной системы [231].

Таким образом, резюмируя вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что белок в продуктах биоконверсии субстратов на основе листьев тополя имеет благоприятный аминокислотный состав.

3.5.3.2 Минеральный состав кормового продукта

При оценке пригодности продуктов биоконверсии, в качестве кормовых добавок был исследован их минеральный состав. Минеральные вещества не обладают энергетической и углеводной питательной ценностью, но они играют важную роль в питании сельскохозяйственных животных. Характерной особенностью минеральных веществ является то, что они не синтезируются в живых организмах и должны регулярно поступать с кормами и водой. Кроме того, большинство эссенциальных макро- и микроэлементов не способны накапливаться в организме животных, даже при их высоком содержании во внешней среде [233, 234]. Основ-

ные макро- и микроэлементы, необходимые для оценки белковых кормовых добавок, представлены в таблице 3.14.

Таблица 3.14 – Элементный состав золы субстратов после биоконверсии грибом

Наименование	Содержание элементов в субстратах, мг/кг			
	Fr5-15 <i>F. pinicola</i>		PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>	
	субстрат 1	субстрат 3	субстрат 1	субстрат 3
Натрий	0,4	4,1	0,6	4,5
Магний	5,4	40,8	4,4	8,7
Фосфор	1,6	11,8	1,4	9,4
Сера	433,9	2894,9	508,2	1411,7
Хлор	424,3	<4,6	55,6	<4,6
Калий	6,8	50,5	6,8	13,5
Кальций	<1,0	<4,5	<2,0	<4,5
Железо	1,4	2,6	0,1	0,8
Алюминий	0,2	0,4	0,2	0,07
Хром	0,04	0,07	0,02	0,03
Марганец	0,2	0,5	0,2	0,1
Кобальт	0,004	0,004	0,006	<0,003
Медь	0,07	0,2	0,06	0,02
Цинк	1,5	2,6	1,8	0,1
Селен	<0,02	<0,1	<0,04	<0,1
Бром	0,08	<0,1	0,04	<0,1
Йод	0,5	0,01	0,08	<0,004

Для обмена веществ животных наибольшее значение имеют микроэлементы, такие как медь, цинк, железо, марганец и йод, их содержание составляет 0,4 % (субстрат 1), 0,2 % (субстрат 3) и 0,1 % (субстрат 1), 0,4 % (субстрат 3) от суммы элементов при культивировании Fr5-15 *F. pinicola* и PP-3.2 *P. pulmonarius* соответственно. Они связаны с ферментами, гормонами и витаминами.

Из макроэлементов наибольшее значение для животных имеют фосфор, кальций, калий, магний, сера, натрий [234], суммарное содержание которых в субстратах составляет 51,2 % (субстрат 1), 99,6 % (субстрат 3) и 90,0 % (субстрат 1), 99,6 % (субстрат 3) от суммы элементов при культивировании Fr5-15 *F. pinicola* и PP-3.2 *P. pulmonarius* соответственно.

По содержанию серы субстраты после биодеструкции соответствуют таким кормам как, например, кукуруза (0,4 г/кг), трава луговая (0,8 г/кг), пшеница яро-

вая (0,5 г/кг) и др. [235]. Сера входит в состав глутатиона, который играет важную роль в окислительных процессах организма, инсулина и других веществ [234].

Важным параметром оценки качества получаемых кормовых добавок является их безопасность по уровню содержания тяжелых металлов, так как они токсичны для животных и снижают питательность кормовой продукции. Согласно ветеринарно-санитарным нормам и требованиям к качеству кормов для животных [207], содержание тяжелых металлов во всех продуктах биоконверсии не превышает предельно допустимых концентраций.

3.5.3.3 Содержание витаминов и нуклеиновых кислот в продуктах конверсии субстратов

Для дополнительной оценки полученных продуктов после биоконверсии было определено содержание в них нуклеиновых кислот и некоторых водорастворимых витаминов, имеющих физиологическую активность в организме животных.

Важным показателем качества кормового продукта является низкое содержание в нем нуклеиновых кислот. Нами установлено, что содержание нуклеиновых кислот в полученных кормовых продуктах, как и в субстратах до биодеструкции, остается на низком уровне и не превышает 1 % от абсолютно сухого сырья [174].

Недостаток или избыток витаминов в кормах наносит ущерб животноводству, снижает ответные иммунные реакции, плодовитость, эффективное использование питательных веществ, продуктивность, вызывает заболевания и падеж, ухудшает качество молока, мяса, яиц, шерсти, шкур пушных зверей, кожевенного сырья. Особенно высокая потребность в витаминах у молодняка, подсосных и высокопродуктивных животных, содержащихся в закрытых помещениях в условиях интенсивной промышленной технологии [236, 237]. Содержание некоторых витаминов представлено в таблице 3.15.

Таблица 3.15 – Содержание витаминов до и после биодеструкции

Витамин	Содержание, мг%					
	субстрат 1			субстрат 3		
	д/б*	п/б**		д/б	п/б	
		Fr5-15	PP-3.2		Fr5-15	PP-3.2
Рутин	0,5	1,0	0,3	0,9	0,2	0,2
Тиамин	0,03	3,4	0,9	0,8	4,9	1,1
Рибофлавин	0,04	1,1	2,1	0,5	5,6	1,8
Аскорбиновая кислота	0,7	0,4	1,2	0,7	0,3	2,4
* д/б – субстрат до биодеструкции; ** п/б – субстрата после биодеструкции; относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %						

В процессе биодеструкции субстратов грибом PP-3.2 *P. pulmonarius* происходит снижение содержания витамина Р (40-78 %). Снижение очевидно связано с тем, что рутин представляет собой гликозид, сочетающий флавонол кверцетина и дисахарид рутинозу, и несет в своей структуре углеводы, которые необходимы грибам для полноценного роста [208, 238].

Известно, что некоторые грибы способны синтезировать витамин С по ксилулозному пути углеводного обмена через промежуточные стадии глюкуроновой и гулоновой кислот [208]. Витамин С участвует в формировании коллагена в реакциях гидроксилирования пролина и лизина, однако поступающий с кормом витамин, в рубце животных разрушается, но синтез его происходит в печени [233]. Установлено, что содержание аскорбиновой кислоты в процессе биодеструкции субстратов грибом PP-3.2 *P. pulmonarius* увеличивается по сравнению с исходными субстратами в 2-3 раза соответственно. При культивировании Fr5-15 *F. pinicola*, наоборот, содержание витамина снижается.

В процессе культивирования содержание витамина В₂ (рибофлавин) увеличивается, поскольку грибы способны его синтезировать. В организме животных рибофлавин участвует в превращении аминокислот, из которых строится белок, и его усвоении в организме [233]. При недостатке рибофлавина понижается интенсивность тканевого дыхания, задерживается рост, понижается резистентность к инфекционным дерматитам [233].

Присутствие витаминов в продуктах биодеструкции увеличивает их питательную ценность, что в свою очередь доказывает актуальность и важность

данной работы.

3.5.3.4 Перевариваемость кормового продукта

Перевариваемость – совокупность гидролитических расщеплений составных частей корма под действием ферментов пищеварительных соков и ферментов микроорганизмов.

Результаты исследования перевариваемости субстратов до и после биоконверсии представлены на рисунке 3.13.

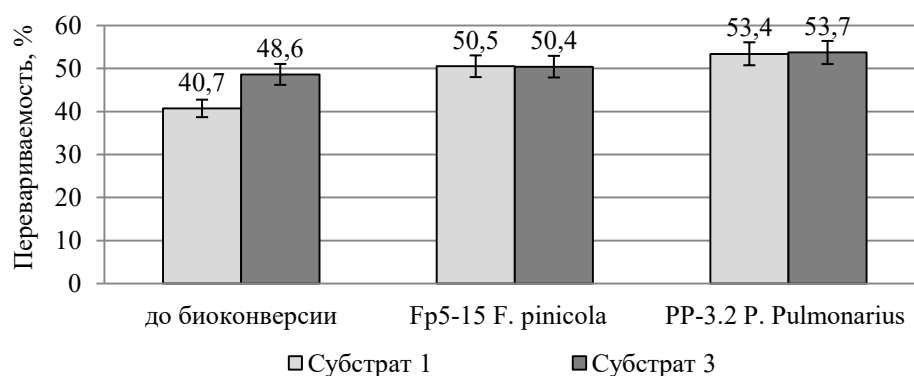


Рисунок 3.13 – Перевариваемость субстратов

Результаты показывают, что перевариваемость субстратов увеличилась по сравнению с исходным растительным сырьем примерно в 1,2-1,3 раза. Полученные показатели соответствуют нормам перевариваемости сухого вещества кормов. Установлено, что перевариваемость субстратов в 1,3-1,4 выше, чем у древесной зелени еловых [163].

Энергетическую питательность корма определяет сырая клетчатка. Жвачные намного превосходят свиней по возможностям переваривания богатых сырой клетчаткой кормов. На то, какое количество сырой клетчатки будет съедено животными, влияет не только перевариваемость сырой клетчатки, но и перевариваемость других питательных веществ [239]. Содержание сырой клетчатки в продуктах биодеструкции составляет 15-22 %, данный показатель соответствует оптимальному количеству в рационе жвачных животных, например, коров.

Установлено, что полученные микробиологической конверсией продукты являются не токсичными в отношении животных (приложение В). Партию кормового продукта для исследования на токсичность нарабатывали методом, изложенным в п. 2.3. Анализ проведен в «Краевой ветеринарной лаборатории» по методикам ГОСТ 31674-2012.

Таким образом, основываясь на полученных результатах исследования химического состава субстратов на основе листьев тополя после микробиологической конверсии, количественном содержании белка и его аминокислотном составе, низком содержании нуклеиновых кислот и тяжелых металлов, отсутствии токсичного воздействия на животных, можно рекомендовать к использованию данные продукты в качестве белковой кормовой добавки.

3.5.4 Результаты культивирования базидиомицетов на смешанных субстратах из вегетативной части растений

Следует отметить, что при использовании древесины тополя для химической переработки и/или в результате весенних обрезок деревьев, также остается биомасса в виде побегов, почек и коры. В силу этого, были исследованы эти части биомассы тополя бальзамического в качестве субстрата для биоконверсии, химический состав которых представлен в таблице Б.1. Пробы почек и однолетних побегов были отобраны в апреле 2021 г. с деревьев, произрастающих в окрестностях г. Красноярска. Для подготовки субстратов к биохимической переработке предварительно из почек тополя были дополнительно извлечены эфирные масла и спирторастворимые компоненты, сдерживающие развитие микроорганизмов [240, 241]. Несмотря на благоприятный химический состав, субстраты на основе коры и однолетних побегов и древесины характеризуются низкими ростовыми показателями (таблица Б.2, Б.3), для их ферментации будет требоваться дополнительная подготовка.

Установлено, что на субстрате, состоящем из твердого остатка почек тополя после удаления эфирных масел и спирторастворимых веществ (п.э.о.), зафиксиро-

ван высокий ростовой коэффициент 40,7 (PP-3.2 *P. pulmonarius*) и 15,7 (Fp5-15 *F. pinicola*), убыль массы при этом составляет 9,4 и 4,4 % соответственно. Из этого следует, что почки можно использовать как самостоятельно, так и совместно с листом для лучшего роста и развития гриба.

Культивирование грибов на смешанных субстратах, состоящих из п.э.о. почек бальзамического тополя и опада в разных соотношениях по массе дало следующие результаты: наиболее благоприятными для роста гриба Fp5-15 *F. pinicola* является субстрат с одинаковым соотношением п.э.о. почек и опада тополя бальзамического (1:1). В процессе увеличения содержания п.э.о. почек в субстрате скорость роста сохраняется высокой (до 3,3 мм/сут), но при этом плотность и высота мицелия ниже, чем на субстрате с соотношением 1:1. Высокие ростовые параметры PP-3.2 *Pleurotus pulmonarius* наблюдаются на субстратах с соотношением п.э.о. почек и опада 1:1, 2:1 и 5:1 (таблица Б.4, Б.5). При соотношении 5:1 ростовой коэффициент 1,6-2,8 раза выше, чем на других субстратах. Увеличение содержания опада в субстрате не приводит к высоким ростовым параметрам гриба. Морфология колонии грибов представлена на рисунке Б.1.

Кроме того, для расширения сырьевой базы возможно использование древесной зелени пихты сибирской (*Abies sibirica*) как крупнотоннажного отхода производства эфирных масел. Из 1 т хвойной древесной зелени вырабатывается от 35 до 50 кг биологически активных веществ, включая 10-20 кг эфирного масла, и водные кормовые продукты [242]. Такие послеэкстракционные отходы можно использовать в качестве добавки к основному субстрату для культивирования базидиальных грибов с дальнейшим получением белковых кормовых продуктов [7, 39]. Как показывают наши исследования, по составу послеэкстракционный остаток древесной зелени пихты после выделения эфирных масел и спиртоэкстрактивных веществ (таблица Б.6) сопоставим с п.э.о. зеленых листьев и почек тополя (см. таблицу 3.4), на долю веществ лигноуглеводного комплекса приходится около 74 %.

Основные ростовые параметры представлены в таблицах Б.7 и Б.8. Результаты показывают, что в составе субстратов для биодеструкции, состоящих из ве-

гетативной части тополя, возможно использование п.э.о. древесной зелени пихты как дополнительного источника питательных веществ для роста грибов. Установлено, что при смешивании опада, п.э.о. почек тополя и п.э.о. древесной зелени пихты улучшаются ростовые параметры грибов PP-3.2 *P. pulmonarius* (скорость роста увеличивается в 1,7 раз и составляет 3,3 мм/сут, ростовой коэффициент – в 1,6 раз). У гриба Fr5-15 *F. pinicola* скорость роста замедляется (1,6 мм/сут), но при этом образуется более плотный мицелий (РК – 8,7).

Также был исследован химический состав субстратов на основе п.э.о. почек и опада (таблица Б.9). В процессе культивирования грибов на п.э.о. почек наибольшему воздействию подвержен полисахаридный комплекс и водозэкстрактивные вещества. Установлено достоверное снижение суммы полисахаридов на 45-50 % независимо от биодеструктора, экстрактивных веществ на 23 % для Fr5-15 *F. pinicola* и 15 % PP-3.2 *P. pulmonarius*.

Гриб PP-3.2 *P. pulmonarius* на смешанном субстрате из опада и п.э.о. почек наиболее полно утилизирует сумму полисахаридов (до 36 %), при этом количество водозэкстрактивных веществ увеличивается на 15 %. В процессе биодеструкции субстрата Fr5-15 *F. pinicola* происходит на 29-30 % снижения суммы полисахаридов и водозэкстрактивных веществ. Под действием ферментов грибов происходит утилизация лигниновых веществ от 16 (PP-3.2 *P. pulmonarius*) до 24 % (Fr5-15 *F. pinicola*). Это подтверждает то, что грибы обладают комплексом лигнинразрушающих ферментов. Грибы, разрушающие лигнин, выделяют фенолоксидазы, поэтому полагают, что именно эти ферменты ответственны за отщепление ароматических соединений [243]. При добавлении к данному субстрату п.э.о. древесной зелени пихты в процессе биоконверсии содержание всех компонентов снижается на 20-28 % (таблица Б.10).

Результаты определения содержания белка на смешанных субстратах представлены в таблице Б.11. Установлено, что продукты биодеструкции имеют в своем составе до 24 % белка. При исследовании содержания состава аминокислот в смешанных субстратах на основе опавших листьев тополя (таблицы Б.12-Б.15) установлено, что на долю незаменимых аминокислот приходится 37-40 %. Преобла-

дающими аминокислотами являются аспаргиновая, глутаминовая, глицин, аланин. В процессе культивирования грибов РР-3.2 *P. pulmonarius* на смешанных субстратах отмечается высокое содержание гистидина.

В биодеструктированных субстратах, состоящий из опада и п.э.о. почек тополя, содержание микроэлементов составляет 0,3 %, макроэлементов – 95 % от суммы элементов, при добавлении в субстрат п.э.о. древесной зелени пихты содержание микроэлементов составляет 0,3-0,5 %, макроэлементов – 69-85 %. Продукт деструкции смешанного субстрата (опад и п.э.о. почек) гриба Fr5-15 *F. pinicola* обогащен магнием, фосфором, серой и калием в сравнение с другими субстратами (таблица Б.16).

Таким образом, проведенные исследования показали, что данные грибы способны колонизировать различные субстраты, состоящие из листьев тополя, однако радиальная скорость роста и ростовой коэффициент различаются. Благоприятными для твердофазного культивирования грибов являются субстраты 1 (опад) и 3 (твердый остаток листьев после спиртовой экстракции). Кроме того, послеэкстракционные остатки почек тополя и древесной зелени пихты также возможно вовлекать в микробиологическую переработку, что создаст благоприятный экологический фон и расширит сырьевую базу для получения продуктов, обогащенных белком.

3.5.5 Результаты культивирования грибов рода *Trichoderma*

Другим направлением переработки растительных субстратов на основе листьев тополя может служить получение биопрепаратов на основе грибов рода *Trichoderma*.

В качестве биодеструкторов в данной работе использованы сибирские штаммы грибов М99-9 *T. aspirellum* и К6-15 *Trichoderma spp.*

Биоконверсию субстратов проводили в течение 21 сут, с отбором проб на 7-е, 11-е, 14-е, 18-е и 21-е сутки от начала культивирования. Результаты определения титра спор исследуемых грибов представлены в таблице 3.16.

Таблица 3.16– Урожай конидий грибов рода *Trichoderma*

Суб-страт	Штамм	Титр, 10 ⁸ КОЕ/г				
		7 сут	11 сут	14 сут	18 сут	21 сут
1	M99-9	2,2	3,0	4,2	1,9	1,8
	K6-15	4,2	5,7	7,1	4,8	2,7
2	M99-9	8,6	16,5	23,3	11,8	10,3
	K6-15	7,4	21,1	35,6	24,7	21,4
3	M99-9	2,3	3,5	4,7	3,9	3,1
	K6-15	4,5	5,3	5,9	3,6	3,1
4	M99-9	1,3	2,9	4,1	2,9	2,1
	K6-15	2,3	3,9	4,7	3,1	2,9
5	M99-9	7,9	14,4	25,1	22,0	21,2
	K6-15	4,2	10,1	18,7	16,9	15,1

Установлено, что на зеленых листьях тополя более интенсивно процесс конидиегенеза протекал у штамма K6-15, у штамма M99-9 конидиеобразование шло менее интенсивно. Так, на 14-е сутки выход конидиоспор штамма K6-15 в 1,5 раза превышал их количество у штамма M99-9. На 18-е сутки культивирования отмечается снижение выхода конидий. Убыль массы субстрата на 21-е сутки культивирования составляет 20,6 (M99-9) и 18,7 % (K6-15). На листьях тополя после удаления основной массы водорастворимых веществ (субстрат 5) более интенсивно процесс конидиегенеза протекал у штамма M99-9. Так, на 14-е сутки культивирования выход конидий этого штамма в 1,3 раза выше, чем у штамма K6-15. На 18-е сутки количество конидий у обоих штаммов снижается. На 21-е сутки биодеструкции убыль массы субстрата составила 21,7 (M99-9) и 15,1 % (K6-15).

В процессе культивирования грибов рода *Trichoderma* на опавших листьях тополя наиболее интенсивно процесс конидиегенеза развивался у штамма K6-15. На 14-е сутки культивирования выход конидий у штаммов K6-15 в 1,7 раз выше, чем у M99-9. Результаты показали, что убыль массы субстрата достигается 7,8 % для штамма M99-9 и 6,1 % для K6-15.

Об эффективности воздействия ферментативного комплекса исследуемых штаммов на субстраты судили по изменению содержания основных компонентов и убыли массы субстрата в процессе культивирования.

Трансформация субстратов приведена на примере опада (субстрат 1), ре-

зультаты представлены в таблице 3.17. Результаты, свидетельствующие об изменении химического состава других субстратов после биодеструкции, представлены в таблицах Г.1, Г.2 приложения Г. Для сравнения химического состава исходного остатка производили пересчет полученных данных с учетом коэффициента убыли массы для каждого образца в процессе культивирования грибов в течение 21 сут.

Таблица 3.17 – Химический состав опада после биодеструкции

Компонент	Штамм	Содержание, % а.с.с.			
		Продолжительность, сут			
		7 сут	14 сут	18 сут	21 сут
Вещества, экстрагируемые горячей водой	М99-9	23,7/22,8	26,2/24,9	28,9/26,7	23,9/22,0
	К6-15	24,6/23,6	26,1/25,0	22,4/21,1	21,7/20,4
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	М99-9	4,6/4,4	3,7/3,5	3,3/3,1	3,2/2,9
	К6-15	4,3/4,1	3,3/3,2	4,5/4,2	3,1/2,9
Легкогидролизуемые полисахариды	М99-9	10,5/10,1	12,3/11,7	12,6/11,7	11,8/10,9
	К6-15	11,4/10,9	10,0/9,6	11,4/10,7	13,3/12,5
Трудногидролизуемые полисахариды	М99-9	11,0/10,6	13,0/12,4	16,4/15,2	18,2/16,8
	К6-15	14,5/13,9	17,2/16,5	14,1/13,3	16,4/15,4
Лигниновые вещества	М99-9	19,3/18,6	18,1/17,3	15,2/17,8	21,1/19,50
	К6-15	17,4/16,7	16,7/16,0	20,2/19,0	20,5/19,2
Минеральные вещества	М99-9	9,4/9,0	9,3/8,9	9,1/8,4	9,0/8,3
	К6-15	9,5/9,1	9,4/9,0	9,3/8,8	8,8/8,3
Примечание – в числителе данные без учета убыли массы, в знаменателе указаны данные с учетом убыли массы					

Полученные данные свидетельствуют о том, что культивирование исследуемых штаммов на листьях тополя приводит к изменению содержания всех компонентов субстрата.

Установлено, что в процессе биодеструкции происходит снижение суммы полисахаридов за счет способности грибов рода *Trichoderma* образовывать целлюлолитические ферменты на природных субстратах и различных растительных отходах. При культивировании штамма М99-9 доля полисахаридов снижается на 16 (субстрат 1), 20 (субстрат 2) и 40 % (субстрат 5), при культивировании штамма К6-15 – на 15 (субстрат 1), 21 (субстрат 2) и 28 % (субстрат 5).

Содержание суммы экстрактивных веществ также уменьшается, при использовании штамма М99-9 их снижается на 53 (субстрат 2), 40 (субстрат 5) и

27 % (субстрат 1), а при использовании штамма К6-15 на, 47 %, 38 % и 32 (соответственно). Исследование состава субстрата 5 показало, что в процессе биодеструкции содержание веществ, экстрагируемых водой, на 21-е сутки культивирования становится, таким же, как в исходном сырье. Это обусловлено гидролизом полисахаридов и образованием водорастворимых соединений.

Из литературы известно, что грибы рода *Trichoderma* являются продуцентами лигнолитических ферментов [9]. Установлено, что в процессе культивирования содержание лигниновых веществ в субстрате из опада снижается на 15-20 % (субстрат 1), зеленых листьев – на 29-40 % (субстрат 2) и послеэкстационного остатка – до 11 % (субстрат 5). При этом отмечено, что в процессе деструкции происходит накопление гуминовых веществ: субстрат 1 – 15 %, субстрат 2 – 22 %, субстрат 5 – 11 %. Гуминовые кислоты способны изменять свойства почв, оказывают прямое физиологическое воздействие на растения, оказывают защитное действие от вредного влияния радиоактивных веществ, а также стимулируют развитие корневых систем [244]. Поэтому полезная деятельность грибов, прежде всего, выражается в гумификации растительного сырья.

Ранее в работе [49] была показана возможность получения препарата типа «Триходерин» на основе п.э.о. почек тополя бальзамического с использованием грибов 10-99 *T. harzianum* ($5,2 \cdot 10^8$ спор/г – 10 сут и $7,0 \cdot 10^8$ спор/г – 32 сут) и МГ-97 *T. aspirellum* ($2,7 \cdot 10^8$ спор/г – 10 сут и $12,0 \cdot 10^8$ спор/г – 32 сут). Поэтому, нами был исследован данный субстрат самостоятельно и в составе опавших листьев тополя для возможности получения биопрепарата с более высоким титром спор.

Установлено, что на п.э.о. почек тополя бальзамического за 14 сут культивирования урожай конидий составляет порядка $1,8 \cdot 10^9$ КОЕ/г (см. таблицу Г.3). При культивировании на почках убыль массы достигается порядка 20 %. На смешанном субстрате прирост конидий за две недели культивирования для штамма К6-15 составил $1,66 \cdot 10^9$ КОЕ/г, а для штамма М99-9 в 1,4 раз меньше ($1,17 \cdot 10^9$ КОЕ/г). Это показывает, что добавление в субстрат послеэкстракционного остатка почек тополя увеличивает образование конидий. Так, прирост конидий

у штамма К6-15 увеличился в 2,3 раза, а у штамма М99-9 в 2,8 раз за две недели культивирования.

В таблице Г.4 представлен химический состав биодеструктированного смешанного субстрата, состоящего из опада и твердого п.э.о. почек тополя.

Установлено, что общее содержание полисахаридов в процессе культивирования снижается для штамма М-99-9 на 45 %, а для К6-15 на 27 %. Количество трудногидролизуемых полисахаридов на 14-е сутки культивирования по сравнению с исходным субстратом уменьшилось для обоих штаммов на 30 %. Следует отметить, что конверсия трудногидролизуемых полисахаридов на смешанном субстрате протекает более глубоко по сравнению с субстратом из опавших листьев.

Содержание лигниновых веществ в субстрате к 14-м суткам культивирования снизилось на 19 % для штамма К6-15 и на 11 % для штамма М99-9. В процессе биодеструкции накапливаются гуминовые вещества, содержание которых составляет 9 % (К6-15) и 12 % (М99-9).

Установлено, что содержание экстрактивных веществ в процессе культивирования обоих штаммов снижается в два раза.

Сравнивая химический состав субстратов после биодеструкции можно судить о том, что грибы рода *Trichoderma* утилизируют основную часть суммы полисахаридов и экстрактивных веществ субстратов. Высокий титр спор и образование в процессе культивирования гуминовых веществ, которые применяют в качестве стимуляторов роста растений, дает основание полагать, что листьев тополя и их послеэкстракционные остатки, а также смешанные субстраты можно использовать в качестве сырья для получения биопрепарата типа «Триходермин» или гумификации почвы.

3.6 Апробация продуктов переработки листьев тополя для получения биологически активных препаратов

Известно, что водные и спиртовые экстракты почек и листьев тополя богаты

биологически активными соединениями [245-247]. Препараты, на основе биологически активных веществ почек и листьев *Populus*, обладают противоопухолевой, противовоспалительной, ранозаживляющей активностью, оказывают бактерицидное, а также росторегулирующее влияние на сельскохозяйственные растения [1, 3, 46, 85]. Применение регуляторов роста растений – это перспективное и быстро развивающееся направление в современных ресурсосберегающих условиях – повышает урожайность и качество продукции растениеводства. Регуляторы роста позволяют повысить устойчивость к неблагоприятным факторам среды: высоким и низким температурам, недостатку влаги [248-250].

Ростостимулирующий эффект водоэкстрактивных веществ листьев тополя. Многочисленными исследованиями выявлено положительное действие стимуляторов роста на всхожесть семян и рост сеянцев хвойных пород. В последнее время все больше внимания уделяется разработке и испытанию экологически безопасных регуляторов роста, полученных из природных источников, в частности из древесной зелени хвойных и лиственных пород, например, из листьев ивы, вегетативной части тополя, корней и веток березы и др. [251-255]. Однако при выращивании сеянцев хвойных влияние экстрактов из листьев тополя бальзамического не изучено.

В России, как и в Красноярском крае в частности, наиболее ценными хвойными породами для промышленного выращивания являются сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) [255].

На первом этапе работы был изучен стимулирующий эффект водного раствора экстрактивных веществ зеленых листьев тополя бальзамического на прорастание семян сосны обыкновенной. Для увлажнения семян использовали водные растворы экстрактивных веществ листьев с концентрацией 0,05 и 0,025 %. Результаты проращивания семян сосны обыкновенной приведены в таблице 3.18.

Полученные в результате проведенных опытов данные показывают, что при обработке семян сосны раствором водоэкстрактивных веществ листьев тополя бальзамического энергия их прорастания оказалась меньше, но всхожесть по сравнению с контролем увеличилась на 2-4 % при концентрации 0,05 и 0,025 %

Таблица 3.18 – Результаты определения всхожести и энергии прорастания семян сосны

Концентрация раствора, %	Параметр	День учёта			
		5-й	7-й	10-й	15-й
Контроль	Оставленных на проращивание, шт.	20	14	10	-
	Проросших, шт.	80	86	90	90
	Загнивших, шт.	-	-	-	10
	Энергия прорастания, %	-	86	-	-
	Всхожесть, %	-	-	-	90
0,025	Оставленных на проращивание, шт.	28	22	6	-
	Проросших, шт.	72	78	94	94
	Загнивших, шт.	-	-	-	6
	Энергия прорастания, %	-	78	-	-
	Всхожесть, %	-	-	-	94
0,05	Оставленных на проращивание, шт.	30	24	8	-
	Проросших, шт.	70	76	92	92
	Загнивших, шт.	-	-	-	8
	Энергия прорастания, %	-	76	-	-
	Всхожесть, %	-	-	-	92

соответственно. Замер на десятые сутки проращивания длины корня и проростка дал следующие результаты: средняя длина корня в контроле составила (36 ± 7) мм, в опытных образцах независимо от концентрации раствора – (46 ± 8) мм. Средняя длина ростка в контроле составила 30 мм, при обработке семян водоэкстрактивными веществами листьев с концентрацией 0,025 % она увеличилась на 67 %, при снижении концентрации водоэкстрактивных веществ вдвое – на 87 %.

Таким образом, проведенные исследования показали, что использование водного раствора экстрактивных веществ тополя бальзамического при проращивании семян сосны обыкновенной в большей степени сказывается на длине проростка и корня, увеличивая их в 1,9 и 1,3 раза соответственно.

На втором этапе работы был изучен стимулирующий эффект водоэкстрактивных веществ листьев тополя бальзамического на прорастание семян сосны обыкновенной в грунте (таблица 3.19, рисунок Д.1). Продолжительность проращивания 30 дней.

Исходя из полученных экспериментальных данных видно, что наибольшую среднюю длину ростка и всхожесть показывают образцы семян, обработанные водорастворимыми веществами листьев тополя с концентрацией 0,025 %.

Таблица 3.19 – Результаты проращивания в почве семян сосны обыкновенной в грунте

Раствор, концентрация	Параметр	Значение
Вода дистиллированная	Средняя длина ростка, см	3,9
	Проросших семян, шт.	40
	Всхожесть, %	33
Водоэкстрактивные вещества, 0,0125 %	Средняя длина ростка, см	2,9
	Проросших семян, шт.	50
	Всхожесть, %	42
Водоэкстрактивные вещества, 0,025 %	Средняя длина ростка, см	4,4
	Проросших семян, шт.	90
	Всхожесть, %	75

Качественные характеристики семян сосны обыкновенной после обработки водоэкстрактивными веществами листьев: энергия прорастания семян сосны на седьмой день проращивания для контрольного образца составила 8,3 %, при обработке раствором водоэкстрактивных веществ с концентрацией 0,025 % – 25 %, с концентрацией 0,0125 % – проросших не было.

Биометрические показатели сеянцев сосны обыкновенной с закрытой корневой системой после обработки водным экстрактом из растущих листьев тополя: масса ростков увеличивается в 1,5 раза при обработке 0,025 %-м раствором водоэкстрактивных веществ, и в 1,1 раза при обработке 0,0125 % по сравнению с контролем.

Ростовые показатели семян сосны на 30-й день проращивания в грунте представлены в таблице 3.20 и на рисунке 3.14.

Таблица 3.20 – Ростовые показатели проростков семян сосны

Показатель, % к контролю	Концентрация водорастворимых веществ, %	
	0,025	0,0125
Длина корня	233	200
Длина ростка	160	103
Длина хвои	129	117
Масса ростка	154	108

Установлено, что наибольший положительный эффект наблюдался при концентрации водоэкстрактивных веществ 0,025 %, масса проростков увеличилась в 1,5 раза, линейные размеры в 1,9 раза. Также наблюдалось улучшение



Рисунок 3.14 – Фотография 30-дневных проростков семян сосны обыкновенной

качества семян сосны обыкновенной – всхожесть повышалась в 2,3 раза.

Таким образом, в результате проведенных исследований показана возможность использования для выращивания посадочного материала водозэкстрактивных веществ листьев тополя бальзамического.

Антифунгальная активность спиртовых экстрактов листьев тополя. Известно, что спиртовые экстракты почек тополя и отдельные его фракции способны подавлять рост и развитие грибов рода *Fusarium*, также оказывают бактерицидное действие в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemoliticus*, *Staphylococcus caseoliticus*, бактериостатическое – в отношении *Staphylococcus aldiconicus* [49].

Наряду с фузариозом распространенным заболеванием является плесневение семян зерновых злаковых культур, вызванное, в частности, грибами рода *Penicillium* [256]. Плесневение семян приводит к снижению всхожести, а также ослабляет сопротивляемость семенного материала к другим болезням. Поэтому целесообразно изучить действие спиртовых экстрактов на рост грибов рода *Penicillium*.

Для установления ингибирующего действия спиртового экстракта листьев и отдельных его фракций были использованы микроскопические грибы рода

Penicillium, выделенные из зараженной пшеницы Новосибирской 31 (*Triticum aestivum* L.) (образец 1 и 2) и заплесневелого пшеничного хлеба (образец 3) (рисунок 2.6, п. 2). Выделенные образцы выращивали на агаризованной сусловой среде, куда предварительно был внесен спиртовой экстракт из расчета 4000 мкг/мл [49]. Результаты культивирования представлены на рисунке 3.15.

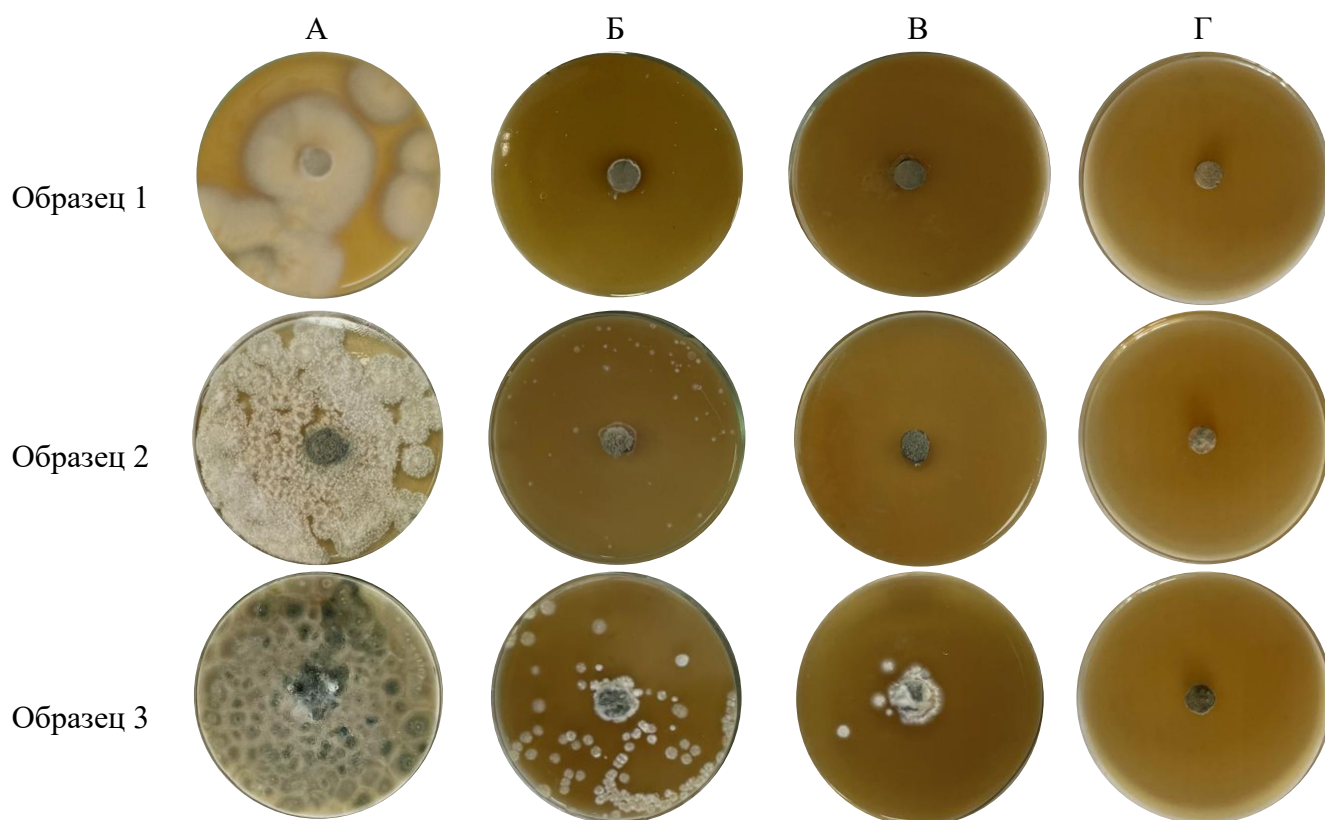


Рисунок 3.15 – Морфология колоний исследуемых образцов на среде сусло-агар (А), с добавлением этилового спирта (Б), спиртового экстракта листьев тополя (В) и спиртового экстракта опада (Г) на 6-е сутки культивирования

Результаты показывают, что спиртовые экстракты листьев тополя проявляют ингибирующие свойства по отношению к выделенным образцам грибов рода *Penicillium*.

Для исследования влияния отдельных фракций спиртового экстракта листьев на антифунгальную активность в сусловую среду вносили петролейный (ПЭ), диэтиловый (ДЭ), этилацетатный (ЭА) и бутанольный экстракты (БЭ) из расчета 4000 мкг/мл. На рисунках 3.16 и 3.17 приведены результаты, полученные при

изучении влияния экстрактов на рост колоний образцов 1-3 грибов рода *Penicillium*.

Полученные результаты свидетельствуют, что отдельные фракции спиртового экстракта, как зеленых, так и опавших листьев способны подавлять рост грибов рода *Penicillium*.

Наименьшей активностью обладает этилацетатный и диэтиловый экстракты. Наилучшая ингибирующая активность экстрактов отмечена у веществ бутанольной фракции, выделенной из опавших листьев.

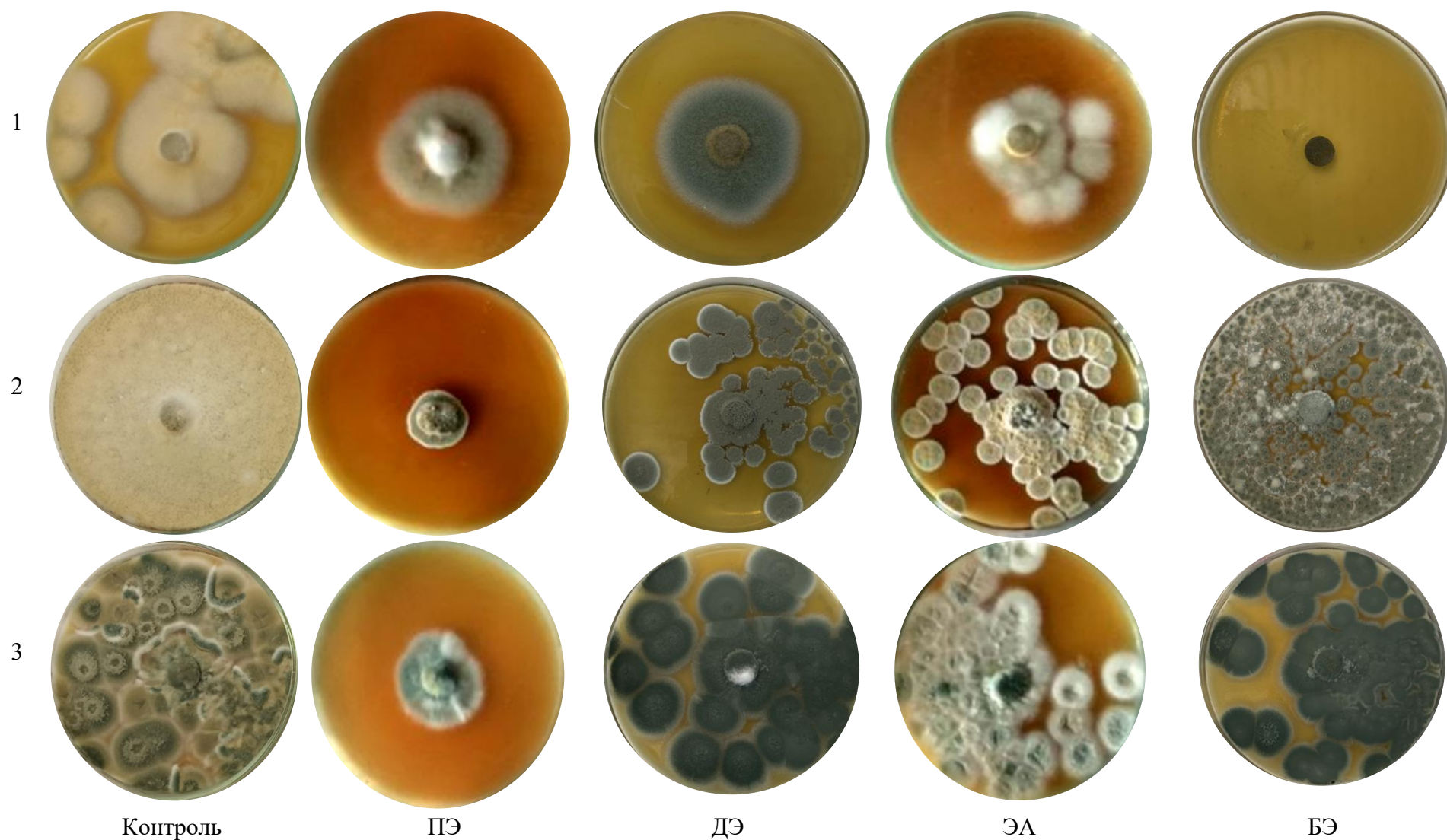
В ходе культивирования установлено, что на среде с добавлением петролейного экстракта все образцы грибов рода *Penicillium* растут радиально до 6 сут (образец 2 и 3) и до 12 сут (образец 1). Также радиальная скорость отмечена у образца 1 на среде с добавлением диэтилового экстракта зеленых (до 6 сут) и опавших (до 4 сут) листьев. На среде без добавления экстрактов грибы начинают образовывать колонии по всей чашке Петри уже на четвертые сутки культивирования.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что спиртовой экстракт листьев и его отдельные фракции способны подавлять рост и развитие грибов рода *Penicillium*.

Также в работе было изучено ингибирующее действие спиртового экстракта листьев тополя на прорастание зараженного зерна пшеницы Новосибирская 31 (*Triticum aestivum* L.) по методике, изложенной в п.п. 2.4.2 [203]. Длину ростка и корня измеряли на 7-й день. Результаты исследования воздействия экстрактов на семена пшеницы представлены на рисунках 3.18.

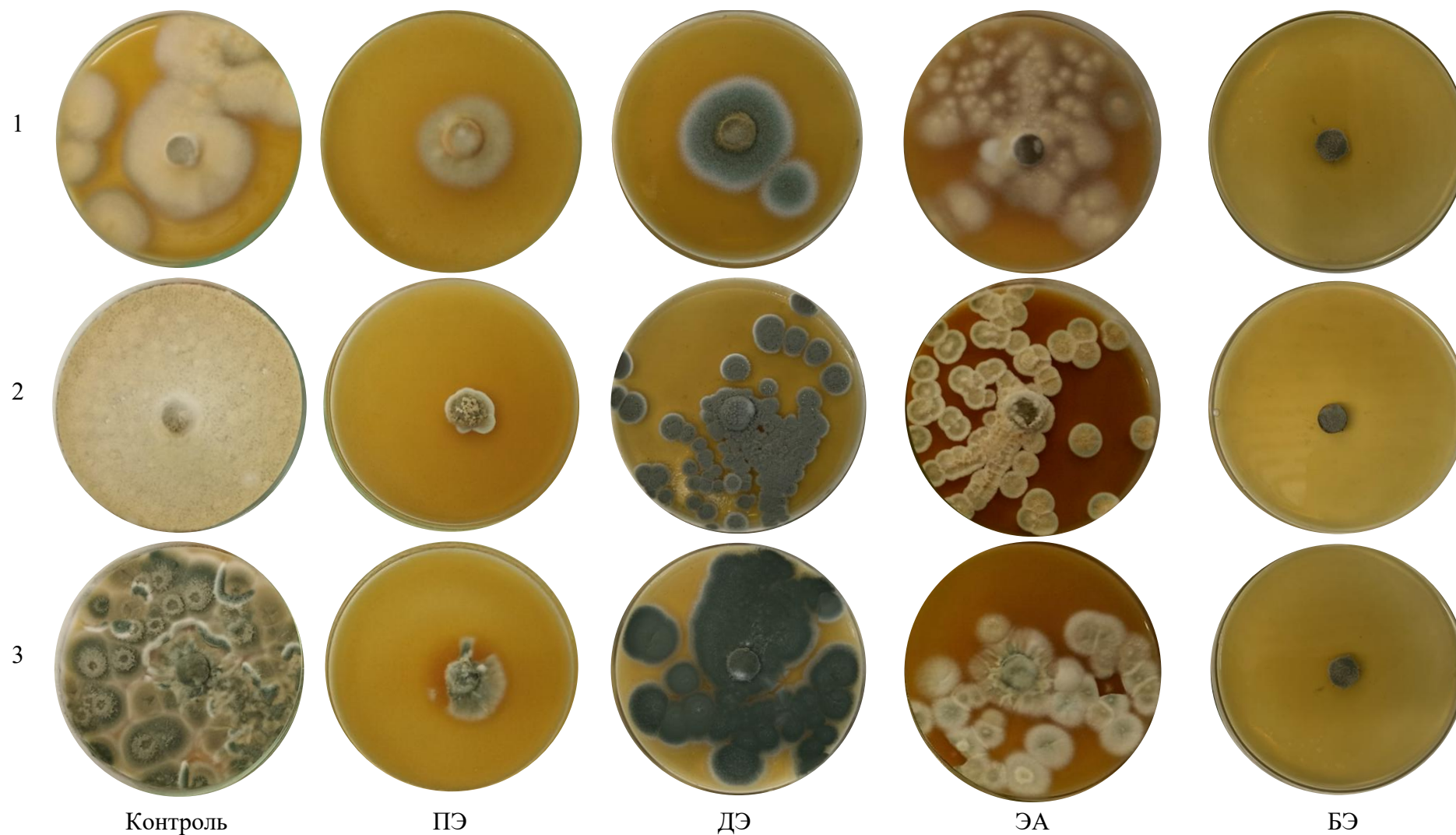
Установлено, что при использовании экстрактов происходит замедление проращивания зерна. Высокими ингибирующими свойствами обладают спиртовые экстракты листьев, в частности диэтиловые и бутанольные фракции.

На рисунке 3.19 представлены результаты изменения количества зараженного зерна при использовании спиртовых экстрактов и их фракций.



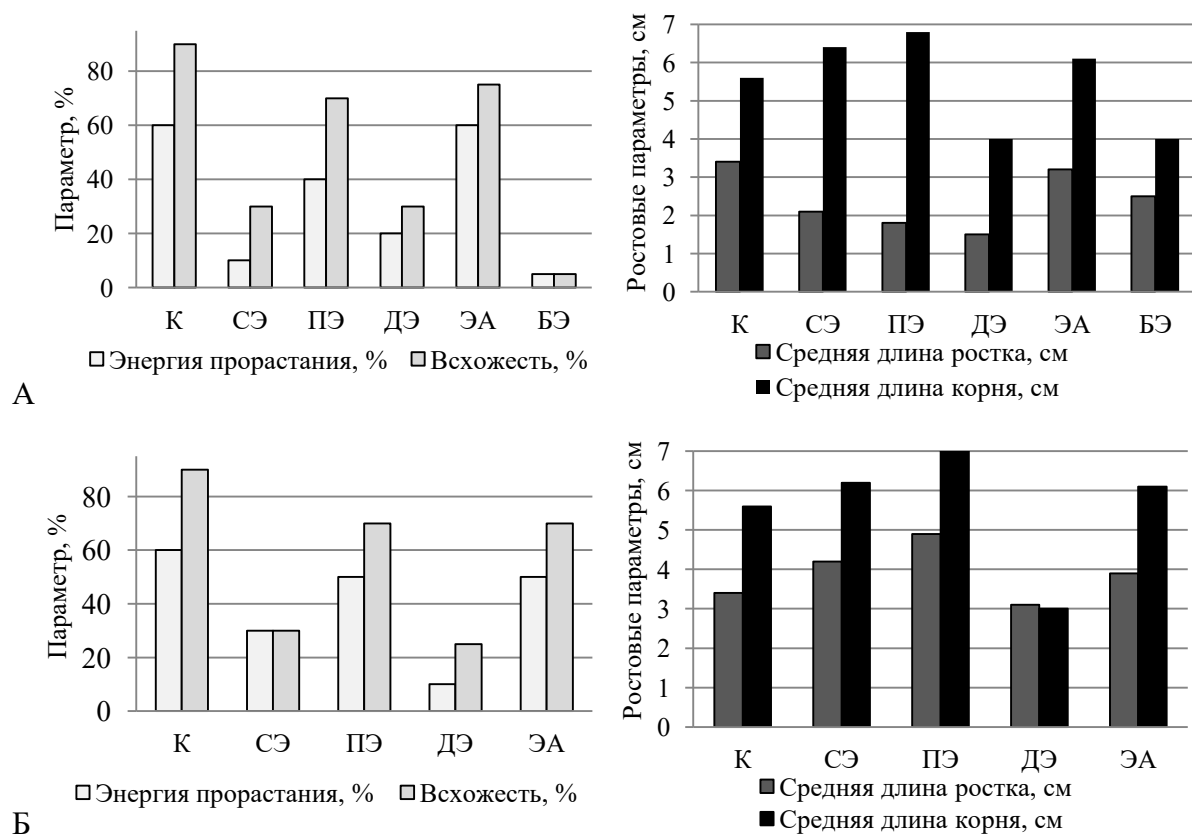
1, 2, 3 – номер образцов грибов рода *Penicillium*

Рисунок 3.16 – Морфология грибов рода *Penicillium* на среде сусло-агар (контроль) и с добавлением экстрактов зеленых листьев (6-е сутки культивирования)



1, 2, 3 – номер образцов грибов рода *Penicillium*

Рисунок 3.17 – Морфология грибов рода *Penicillium* на среде сусло-агар (контроль) и с добавлением экстрактов опавших листьев (6-е сутки культивирования)



А – экстракты зеленых листьев, Б – экстракты опавших листьев

Рисунок 3.18 – Влияние экстрактов на прорастание зерна пшеницы (К – контроль)

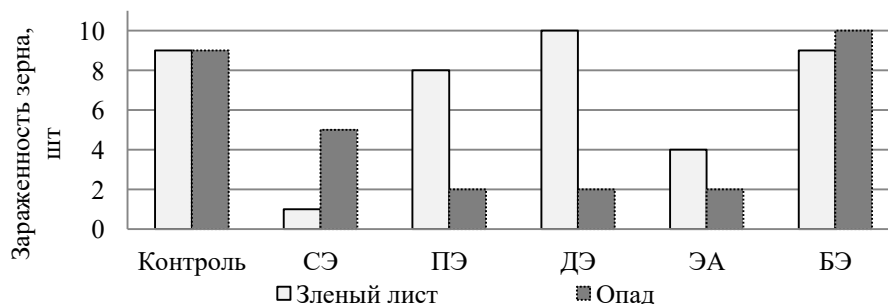


Рисунок 3.19 – Зараженность зерна после обработки экстрактами листьев тополя

Полученные в результате проведенных опытов данные показывают, что в результате обработки веществами петролейного и этилацетатного экстрактов число зараженных семян становится меньше, причем большей ингибирующей способностью обладает этилацетатный экстракт листьев. Такое действие может быть связано с тем, что в этилацетат могут переходить флавоноиды, которые об-

ладают антимикробным действием.

Наибольший эффект достигнут при обработке семян пшеницы Новосибирская 31 веществами суммарного спиртового экстракта листьев, позволившими снизить заражённость зерна с 90 % в контроле (дистиллированная вода) до 10 %.

При последующем проращивании обработанного экстрактивными веществами листьев тополя зерна пшеницы Новосибирская 31 были получены следующие результаты:

- зерно сохраняет способность к проращиванию;
- энергия прорастания, всхожесть и длина ростка несколько снижается по сравнению с контролем;
- длина корня по сравнению с контролем увеличивается и составляет в среднем +115 % к контролю (при использовании экстрактов, как зеленых, так и опавших листьев).

Исследование биопрепарата типа «Триходермин». Исследование проводили на примере биопрепарата, полученного в процессе деструкции опада с использованием штамма K6-15 *Trichoderma spp.* (титр $7,1 \cdot 10^8$ КОЕ/г). Практикуют различные способы внесения препаратов, такие как обработка семян, внесение в грунт, опрыскивание [257-260]. Эксперименты по оценке эффективности препарата проводили двумя методами, при этом использовали семена томата и зараженное грибами рода *Penicillium* зерно пшеницы. Первый метод заключался в опудривании семян биопрепаратом, второй – внесение препарата в почву (0,05 г и 0,01 г на 20 см³ земли). В эксперименте оценивали всхожесть и число зараженных семян.

На рисунке 3.20 представлены результаты всхожести семян томата с использованием препарата типа «Триходермин».

Установлено, что с использованием метода опыления всхожесть семян томата на 5-е сутки составила 100 %, что в два раза выше по сравнению с контролем. В процессе обработки почвы биопрепаратом 100 % всхожесть наблюдалась на 6-е сутки проращивания при внесении препарата с концентрацией 0,05 г/20 см³.

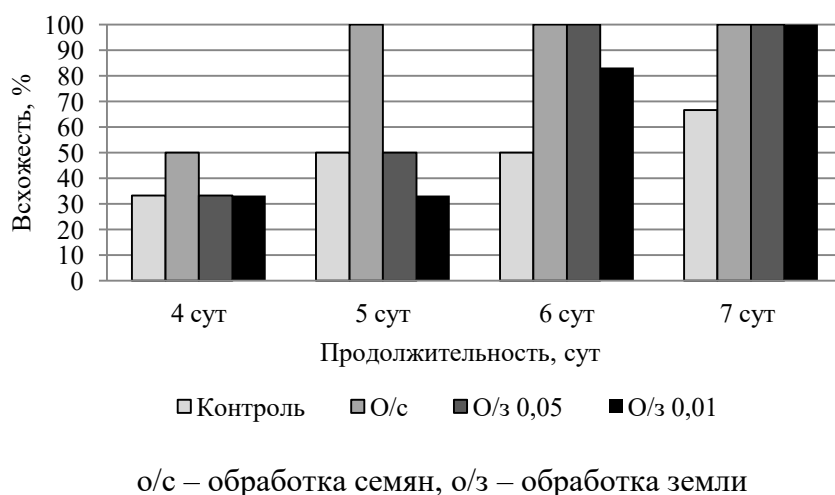


Рисунок 3.20 – Всхожесть семян томата

Результаты проращивания зерна зараженной пшеницы представлены на рисунке 3.21.

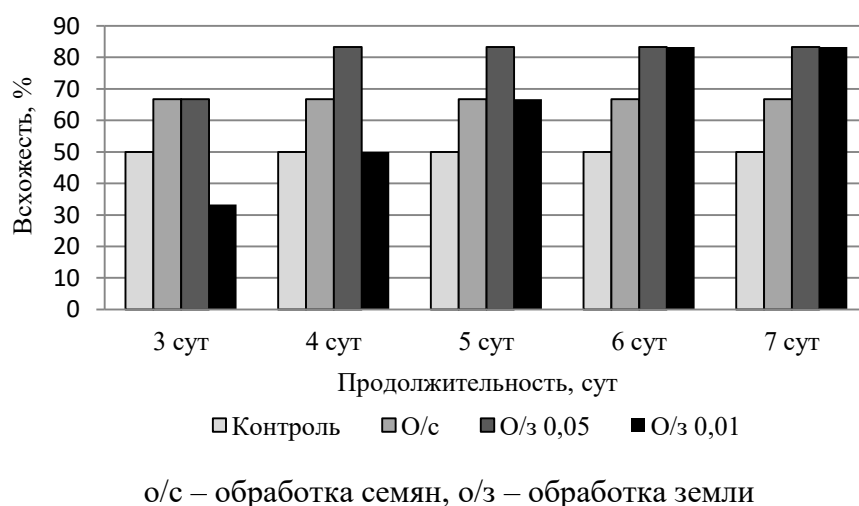


Рисунок 3.21 – Всхожесть зерна пшеницы

Из рисунка 3.22 видно, что при обработке зараженного зерна пшеницы методом опыления всхожесть увеличилась в 1,3 раза и уже на 3-и сутки составила +136 % к контролю. В процессе обработки земли максимальная всхожесть (+166 % к контролю) наблюдалась при внесении препарата с концентрацией 0,05 г/20 см³. В процессе проращивания у 33 % зерна (контроль) обнаружены следы гнили, при использовании биопрепарата следов гнили не обнаружено.

Результаты исследования показали, что использование препарата повышает всхожесть семян и уменьшает содержание гнили, обнаруженной в процессе проращивания зерна пшеницы.

Таким образом, из полученных результатов следует, что спиртовой экстракт листьев проявляет антифунгальную активность в отношении фитопатогенных штаммов грибов рода *Penicillium*. Использование спиртовых экстрактов листьев снижает зараженность зерна от 33 до 73 %. К снижению зараженности семян приводит и обработка их биопрепаратом типа «Триходермин». Полученные данные представляют интерес для дальнейших исследований с целью создания полифункциональных биопрепаратов для защиты растений.

3.7 Определение условий культивирования базидиальных грибов

В данной работе для построения математической модели процесса культивирования базидиальных грибов, проверки её адекватности и для оценки влияния на процесс каждого учитываемого технологического фактора было изучено влияние фракционного состава сырья, температуры и продолжительности на рост, развитие продуцента и выход конечного продукта (ВП).

На первом этапе работы было изучено влияние фракционного состава (крупности) сырья (опада) на ростовые параметры грибов Fr5-15 *F. pinicola* и PP-3.2 *P. pulmonarius* с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Одной из главных задач такого анализа является оценка величины влияния конкретного уровня фактора на изучаемый выходной параметр. Матрица планируемого эксперимента представлена в приложении Е (таблица Е.1).

На рисунках 3.22 и 3.23 представлены полученные средние значения и доверительные интервалы выходных параметров с вероятностью 95 % при культивировании грибов на опаде с разным фракционным составом (1 – 1-2 мм, 2 – 3-4 мм, 3 – 5-6 мм, 4 – 7-8 мм, 5 – 10-12 мм).

Результаты исследования показали, что наилучшие ростовые параметры гриб Fr5-15 *F. pinicola* имеет при культивировании на субстрате с крупно-

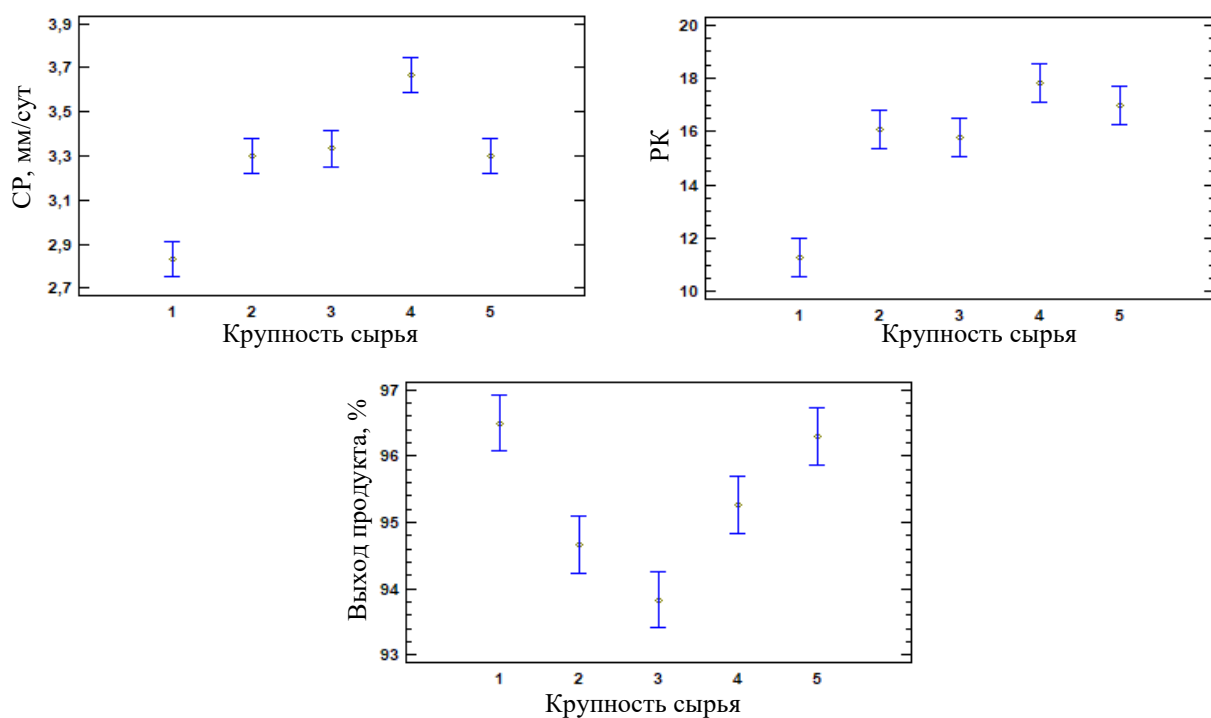


Рисунок 3.22 – Средние значения доверительных интервалов выходных параметров с вероятностью 95 % при культивировании Fp5-15 *F. pinicola*

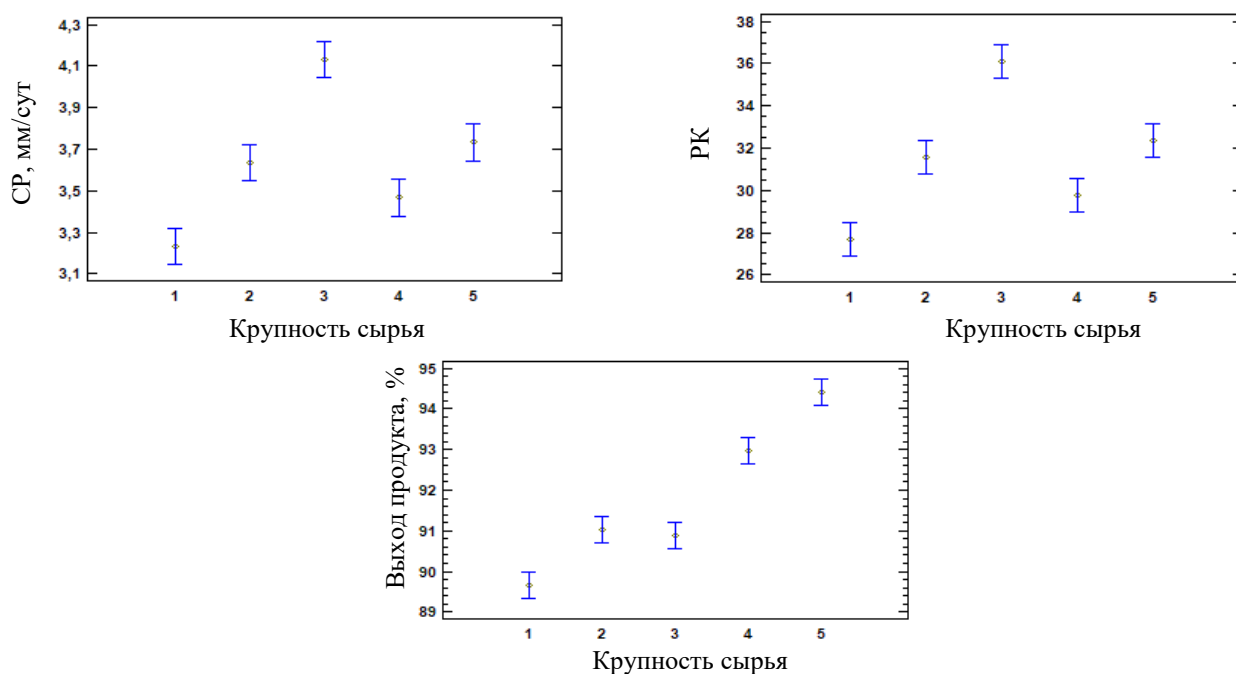


Рисунок 3.23 – Средние значения доверительных интервалов выходных параметров с вероятностью 95 % при культивировании PP-3.2 *P. pulmonarius*

стью 7-8 мм, а PP-3.2 *P. pulmonarius* – 5-6 мм. В процессе роста грибы утилизируют питательные вещества в субстрате, поэтому при высоком росте наблюдается низкие значения выхода продукта.

Таким образом, наиболее благоприятная крупность для растительного сырья является 5-6 мм (PP-3.2 *P. pulmonarius*) и 7-8 мм (Fr5-15 *F. pinicola*). Дальнейшие исследования по биоконверсии проводили с учетом полученных данных.

Кроме того, на степень биоконверсии влияет температура и продолжительность культивирования грибов. Для получения математической модели процесса культивирования от выбранных переменных и определения оптимальных значений температуры (x_1) и продолжительности (x_2) культивирования использовали метод в виде плана на кубе. Уровни и интервалы варьирования исследуемых факторов представлены в методической части п. 2.5.

Матрицы планируемых экспериментов влияния температуры и продолжительности на рост грибов, культивируемых на опаде и п.э.о. зеленых листьев представлены в таблицах Е.2, Е.3).

Результаты эксперимента использовали для расчета коэффициентов уравнения регрессии:

1. Культивирование Fr5-15 *F. pinicola* на опавших листьях

$$CP = -33,6306 + 2,40167x_1 + 1,1625x_2 - 0,0386667x_1^2 - 0,0275x_1x_2 - 0,0291667x_2^2$$

$$PK = -9,9416 + 4,985x_1 - 7,6125x_2 - 0,106x_1^2 - 0,0825x_1x_2 + 0,225x_2^2$$

$$BP = 102,953 + 0,611667x_1 - 2,00417x_2 - 0,0106667x_1^2 - 0,0025x_1x_2 + 0,0583333x_2^2$$

2. Культивирование PP-3.2 *P. pulmonarius* на опавших листьях

$$CP = -23,8583 + 1,52833x_1 + 1,5375x_2 - 0,022x_1^2 - 0,0325x_1x_2 - 0,0375x_2^2$$

$$PK = -35,5028 + 0,675x_1 + 12,7458x_2 + 0,0446667x_1^2 - 0,3225x_1x_2 - 0,233333x_2^2$$

$$BP = 89,95 + 0,923333x_1 - 0,966667x_2 - 0,016x_1^2 + 0,005x_1x_2 - 0,0125x_2^2$$

3. Культивирование Fr5-15 *F. pinicola* на твердом остатке после удаления спиртоэкстрактивных веществ

$$CP = -21,1667 + 1,70667x_1 + 0,5x_2 - 0,032x_1^2 + 0,0x_1x_2 - 0,025x_2^2$$

$$PK = -251,347 + 20,3817x_1 + 5,62083x_2 - 0,384667x_1^2 + 0,0175x_1x_2 - 0,304167x_2^2$$

$$BP = 53,7522 + 2,99667x_1 + 1,71333x_2 - 0,0501333x_1^2 - 0,025x_1x_2 - 0,130833x_2^2$$

4. Культивирование РР-3.2 *P. pulmonarius* на твердом остатке после удаления спиртоэкстрактивных веществ

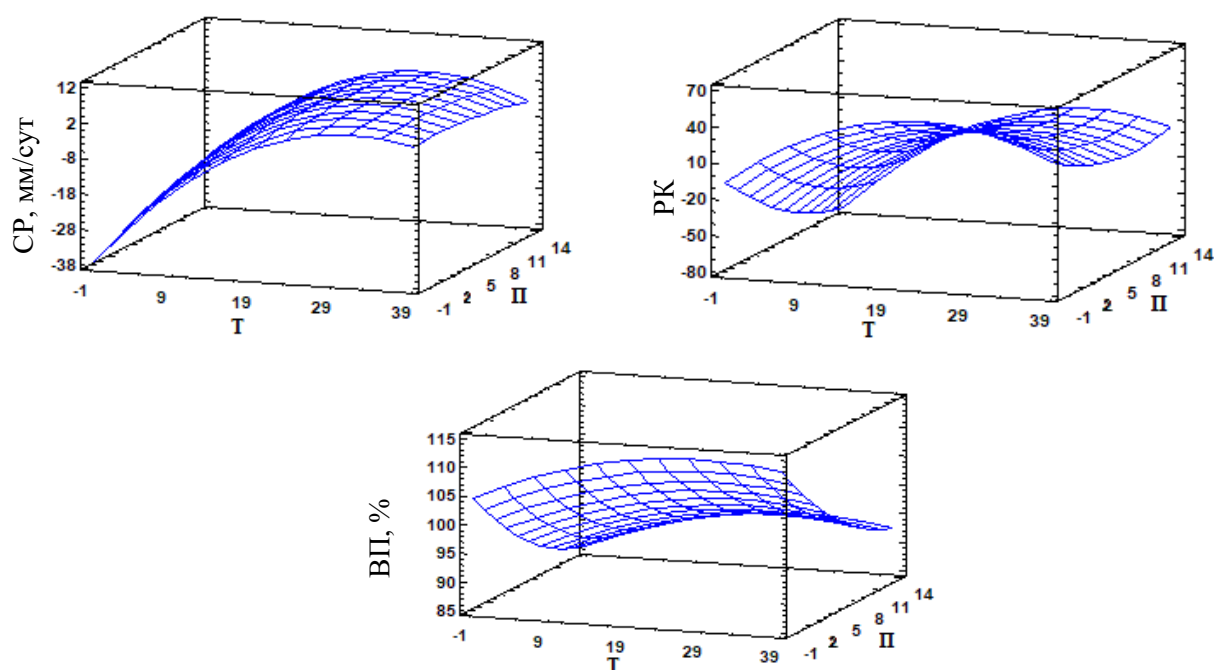
$$CP = -29,0722 + 2,05x_1 + 1,28333x_2 - 0,0426667x_1^2 + 0,015x_1x_2 - 0,0791667x_2^2$$

$$PK = -527,825 + 37,0017x_1 + 23,5875x_2 - 0,77x_1^2 + 0,2675x_1x_2 - 1,4375x_2^2$$

$$ВП = 137,342 - 2,85x_1 - 0,213333x_2 + 0,0614667x_1^2 - 0,04x_1x_2 - 0,0233333x_2^2$$

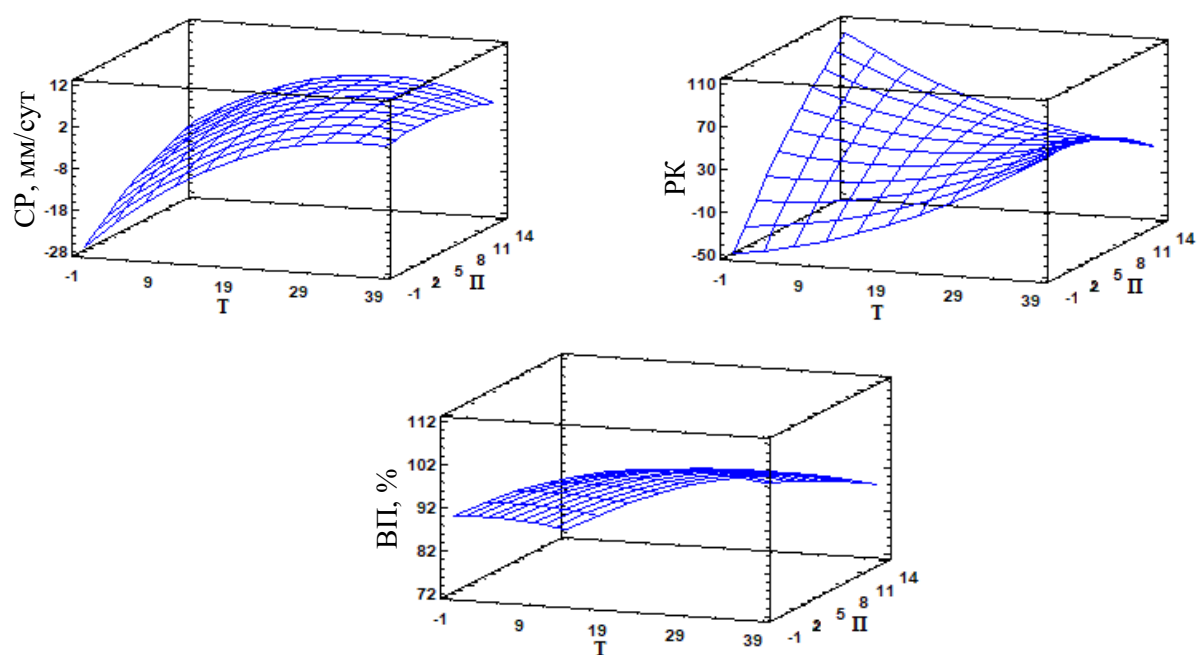
Значимость коэффициентов оценивали по критерию Стьюдента (t-критерия), адекватность полученных математических моделей была определена с помощью критерия Фишера (F-критерия).

Из результатов дисперсионного анализа следует, что статистически значимым выходным параметром является тот, у которого величина уровня значимости (Р-критерий) меньше 0,05. Для наглядности влияния независимых переменных на выходной параметр в работе представлены карты Парето (рисунки Е.1-Е.4), поверхности отклика (рисунки 3.24-3.27). Вертикальная линия на карте Парето соответствует границе статистической значимости эффектов при уровне значимости 5 %.



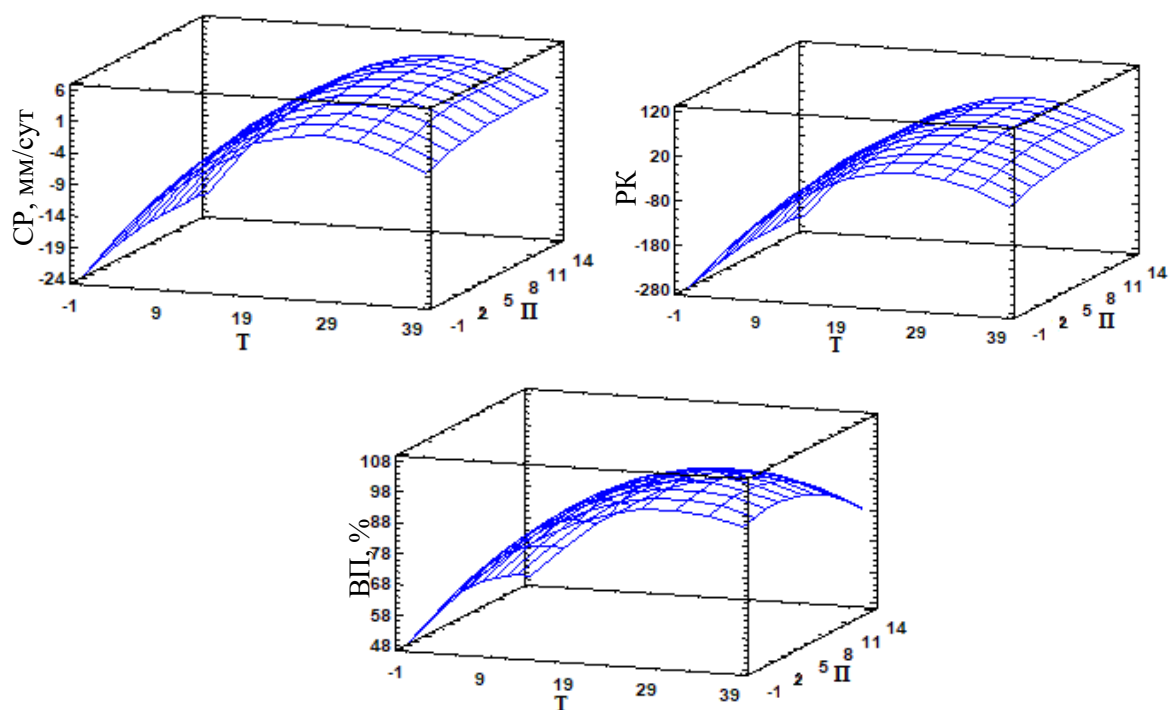
T – температура, °C; П – продолжительность, сут

Рисунок 3.24 – Поверхности отклика выходных параметров, полученные в результате культивирования Fr5-15 *F. pinicola* на опавших листьях



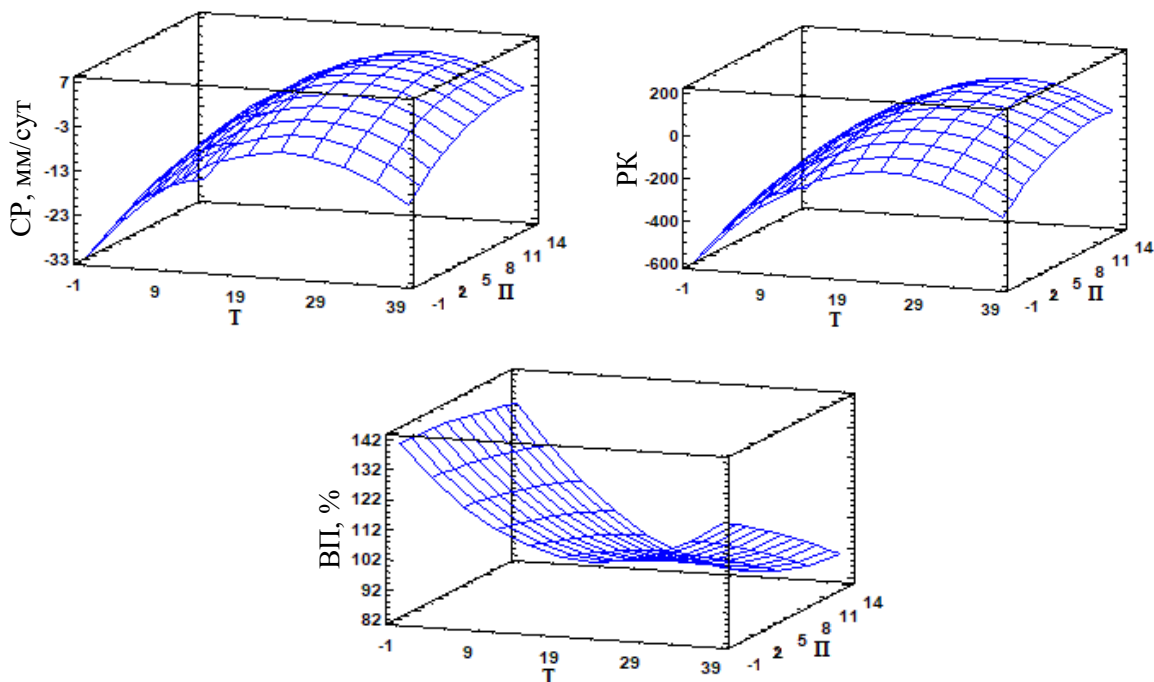
T – температура, °C; П – продолжительность, сут

Рисунок 3.25 – Поверхности отклика выходных параметров, полученные в результате культивирования PP-3.2 *P. pulmonarius* на опавших листьях



T – температура, °C; П – продолжительность, сут

Рисунок 3.26 – Поверхности отклика выходных параметров, полученные в результате культивирования Fr5-15 *F. pinicola* на п.э.о. зеленых листьев



T – температура, °C; П – продолжительность, сут

Рисунок 3.27 – Поверхности отклика выходных параметров, полученные в результате культивирования PP-3.2 *P. pulmonarius* на п.э.о. зеленых листьев

Результаты выполненного теста показывают, что статистически значимым параметром для культивирования грибов является температура (Т) и ее парное взаимодействие (ТТ). Эти параметры влияют на скорость роста гриба (СР) при культивировании на опаде. Также замечено, что при культивировании гриба на Fr5-15 *F. pinicola* на опавших листьях на выход продукта существенно влияет продолжительность (П) биодеструкции. С увеличением продолжительности биодеструкции происходит уменьшение количества конечного продукта (ВП) за счет биотрансформации грибом субстрата.

В процессе культивирования гриба Fr5-15 *F. pinicola* п.э.о. на зеленых листьях отмечено статистически значимое влияние температуры и ее парное влияние на скорость роста и ростовой коэффициент.

С помощью программы STATGRAPHICS® Centurion определены максимальные значения параметров, которые представлены в таблице 3.21.

Таблица 3.21 – Максимальные значения входных и выходных параметров

Культивирование Fp5-15 <i>F. pinicola</i> на опавших листьях								
СР, мм/сут	T, °C	П, сут	РК	T, °C	П, сут	ВП, %	T, °C	П, сут
4,577	28,211	8,0	18,714	26,622	8,0	98,856	27,731	8,0
Культивирование гриба PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i> на опавших листьях								
4,322	28,817	8,012	37,814	20,0	12,0	95,916	30,2	8,0
Культивирование гриба Fp5-15 <i>F. pinicola</i> п.э.о. на зеленых листьях								
4,089	26,667	9,999	49,083	26,72	10,009	98,088	27,892	8,0
Культивирование гриба PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i> п.э.о. на зеленых листьях								
4,228	25,879	10,556	75,945	25,871	10,611	95,329	20,0	8,0

Сравнение полученных в процессе математической обработки теоретических результатов с экспериментальными данными показывает их соответствие. На примере культивирования грибов Fp5-15 *F. pinicola* на опавших листьях в оптимальных условиях установлено, что значения ростовых параметров составляют 93 %, при этом выход продукта – 99 % от теоретически возможного.

Следует отметить, что с технологической точки зрения целесообразно использовать следующие технологические параметры:

- крупность сырья 5-6 мм (PP-3.2 *P. pulmonarius*) и 7-8 мм (Fp5-15 *F. pinicola*);
- температура (25±2) °C;
- продолжительность 8-10 сут.

Выводы к главе 3:

- в листьях тополя содержится от 34 % (опавшие) и до 56 % а.с.с. (зеленые) экстрактивных веществ, доля спиртоэкстрактивных веществ составляет от 7 (опавшие) до 52 % от суммы экстрактивных веществ (зеленые). Сумма полисахаридов варьирует от 23 (зеленые листья) до 33 % а.с.с. (опад). Доля легкогидролизуемых полисахаридов в общей массе углеводов листьев тополя колеблется в пределах от 47 % (зеленый лист) до 53 % (опад). В составе лигноуглеводного комплекса содержание лигниновых веществ составляет от 14 % (зеленые листья) до 20 % (опад). Содержание минеральных веществ в листьях тополя находится в диапазоне от 7 до 10 % а.с.с. Основными элементами являются сера,

фосфор, магний, кальций, железо и натрий. Содержание белка составляет от 9 (опад) до 12 % (зеленые листья), на долю незаменимых аминокислот белков приходится 79 % (опад) и 49 % (зеленые) листья. Содержание рутина составляет 0,5-0,9 мг %, тиамин – 0,03-1,1 мг %, рибофлавин 0,04-0,7 мг %, аскорбиновой кислоты – 0,04-0,9 мг %;

- основной группой водозэкстрактивных веществ листьев тополя являются углеводы (27 % – опад и 37 % от с.в.э. – зеленые листья), на долю олигосахаридов приходится 10-15 % с.в.э. Содержание белковых веществ составляет 40-50 %, минеральных – до 12 %. Установлено, что водозэкстрактивные вещества листьев тополя с концентрацией 0,025 % способны положительно влиять на всхожесть и формирование ростка семян сосны сибирской;

- содержание липидов в спиртовых экстрактах листьев тополя составляет 2,5-4 %, на долю нейтральных липидов приходится 53-67 %. Установлено, что в составе нейтральных липидов опада присутствуют свободные жирные кислоты, триацилглицериды и углеводы. Содержание каротиноидов в листьях составляет 0,11-0,22 %, в составе обнаружены ксантофилы и каротин.

Установлено, что наибольшее количество веществ в этанольном экстракте листьев приходится на вещества, выделенные этилацетатом (47 % – зеленые листья 60 % – опад). В составе фракций спиртовых экстрактов присутствуют кислородсодержащие (31- 99 %), кремний (до 65 %) содержащие соединения, углеводы от C_{20} и выше (до 63 %), также присутствуют бром-, фтор-, серо-, и азотсодержащие соединения. Установлено, что спиртовой экстракт листьев и его отдельные фракции способны подавлять рост и развитие грибов рода *Penicillium*;

- в процессе культивирования базидиальных грибов, установлено, что субстраты на основе листьев тополя являются благоприятными для биоконверсии. Штаммы грибов утилизируют основную часть экстрактивных веществ (29-45 %) и полисахаридов (12-28 %) субстратов.

Кормовые продукты характеризуются благоприятным химическим составом: высоким уровнем белка (до 23-30 %) с содержанием от 51 до 87 % незаменимых аминокислот; низким уровнем нуклеиновых кислот, менее 1 % а.с.с.; на-

личием 15-22 % клетчатки, присутствием витаминов В₁ – 1,1-4,9, В₂ – 1,1-5,6, С – 0,4-2,4, Р – до 0,8 мг%. Содержание тяжелых металлов не превышает предельно допустимых концентраций. Перевариваемость кормовых продуктов составляет до 54 %;

- установлено, что в процессе биодеструкции субстратов штаммами М99-9 *Trichoderma asprellum* и К6-15 *Trichoderma spp.* уже через две недели культивирования наблюдается высокий урожай конидий (до $3,4 \cdot 10^9$ КОЕ/г), который соответствует нормам для получения биопрепарата типа «Триходермин». При дальнейшем культивировании биопрепарат может быть внесен в почву для гумификации, поскольку накапливается до 22 % гуминовых кислот. Установлено, что обработка биопрепаратом семян пшеницы приводит к снижению их зараженности;

- проведен подбор условий культивирования базидиальных грибов. Установлены следующие технологические параметры: крупность сырья 5-6 мм (РР-3.2 *P. pulmonarius*) и 7-8 мм (Fr5-15 *F. pinicola*); температура (25 ± 2) °С; продолжительность культивирования 8-10 сут.

ГЛАВА 4 ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ ЛИСТЬЕВ ТОПОЛЯ С ПОЛУЧЕНИЕМ БАВ И КОРМОВЫХ ПРОДУКТОВ

Для проектирования опытного производства выбрана мощность по переработке 100 т зеленых листьев и 64 т опавших листьев тополя в год.

Технология предусматривает выделение водо- и спирторастворимых веществ из зеленых листьев тополя и утилизацию послеэкстракционного остатка (с добавлением опавших листьев) с получением белкового кормового продукта и биопрепарата типа «Триходермин». На основе результатов экспериментального исследования, изложенных в главе 3, определены количественные характеристики, требуемые для технологических расчетов (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Исходные данные для расчета

Наименование показателя	Единица измерения	Величина показателя
1	2	3
1 Режим работы		
1.1 Количество рабочих дней в году	дн.	345
1.2 Количество рабочих смен в сутки		3
1.3 Мощность производства		по сырью
2 Сырье		зеленые и опавшие листья тополя
2.1 Крупность сырья	мм	5-6
2.2 Влажность сырья	%	10
2.3 Химический состав массы:		
- экстрактивные водой	%	не менее 25
- экстрактивные спиртом	%	не менее 25
2.4 Содержание гнили		не допускается
2.5 Срок хранения сухого измельченного сырья без видимых изменений состава	г	1
2.6 Этиловый спирт	%	96
2.7 Соотношение п.э.о зеленых листьев и опада для производства биопрепаратов		1:1
3 Экстракция		
3.1 Экстрагент		вода/этиловый спирт
3.2 Гидродомуль		20
3.3 Концентрация этилового спирта	%	70
3.4 Температура	°С	70
3.5 Продолжительность	ч	3

1	2	3
4 Биоконверсия		
4.1 Получение «Триходермина»		
4.1.1 Продуцент		K6-15 <i>Trichoderma spp.</i>
4.1.2 Влажность субстрата	%	65-70
4.1.3 Температура культивирования	°C	28±2
4.1.3 Продолжительность	дн.	10
4.2 Получение белкового кормового продукта		
4.2.1. Продуцент		PP-3.2 <i>Pleurotus pulmonarius</i>
4.2.2 Влажность субстрата	%	65-70
4.2.3 Температура культивирования	°C	25±2
4.2.3 Продолжительность	дн.	10

Блок-схема процесса получения продуктов переработки листьев тополя приведена на рисунке 4.1.

Растительное сырье (зеленые и опавшие листья тополя) доставляют автотранспортом в подготовительное отделение цеха. Сырье взвешивают и сортируют, при этом из сырья удаляют различные примеси и загрязнения. В соответствии с технологической схемой переработки листьев (рисунок 4.2) листья сушат и измельчают до размера частиц 5-6 мм. На этой стадии используют агрегат сушки-измельчения АС-4 (1). Конструктивно аппарат представляет собой стальной параллелепипед, внутри которого расположен высокоскоростной активатор и специальные направляющие. Движение сырья внутри агрегата организовано таким образом, что частицы обрабатываемого материала испытывают удары активатора и множественные взаимные встречные соударения. Эти многократно повторяющиеся соударения и взаимное трение приводят к измельчению и одновременному нагреву сырья, что, в конечном счете, приводит еще и к его высушиванию. Для удерживания сырья в рабочей камере до момента достижения необходимой влажности или размера частиц служит специально разработанная система динамической классификации сырья. Отделение системы от внешней среды осуществляется шлюзовыми затворами.

Далее необходимое количество измельченного сырья поступает с помощью транспортера на переработку в экстракционное отделение. Экстрактор (2)

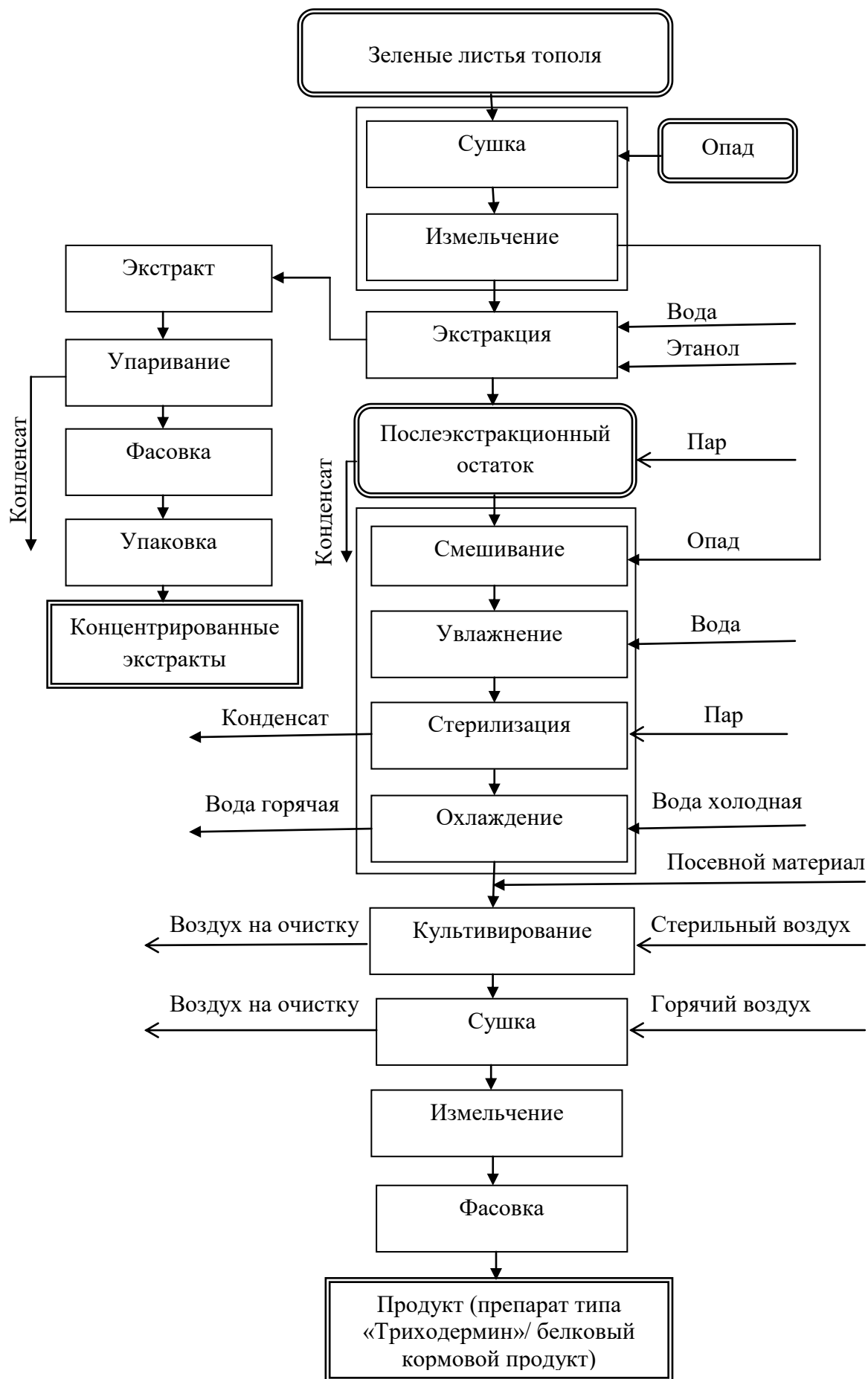
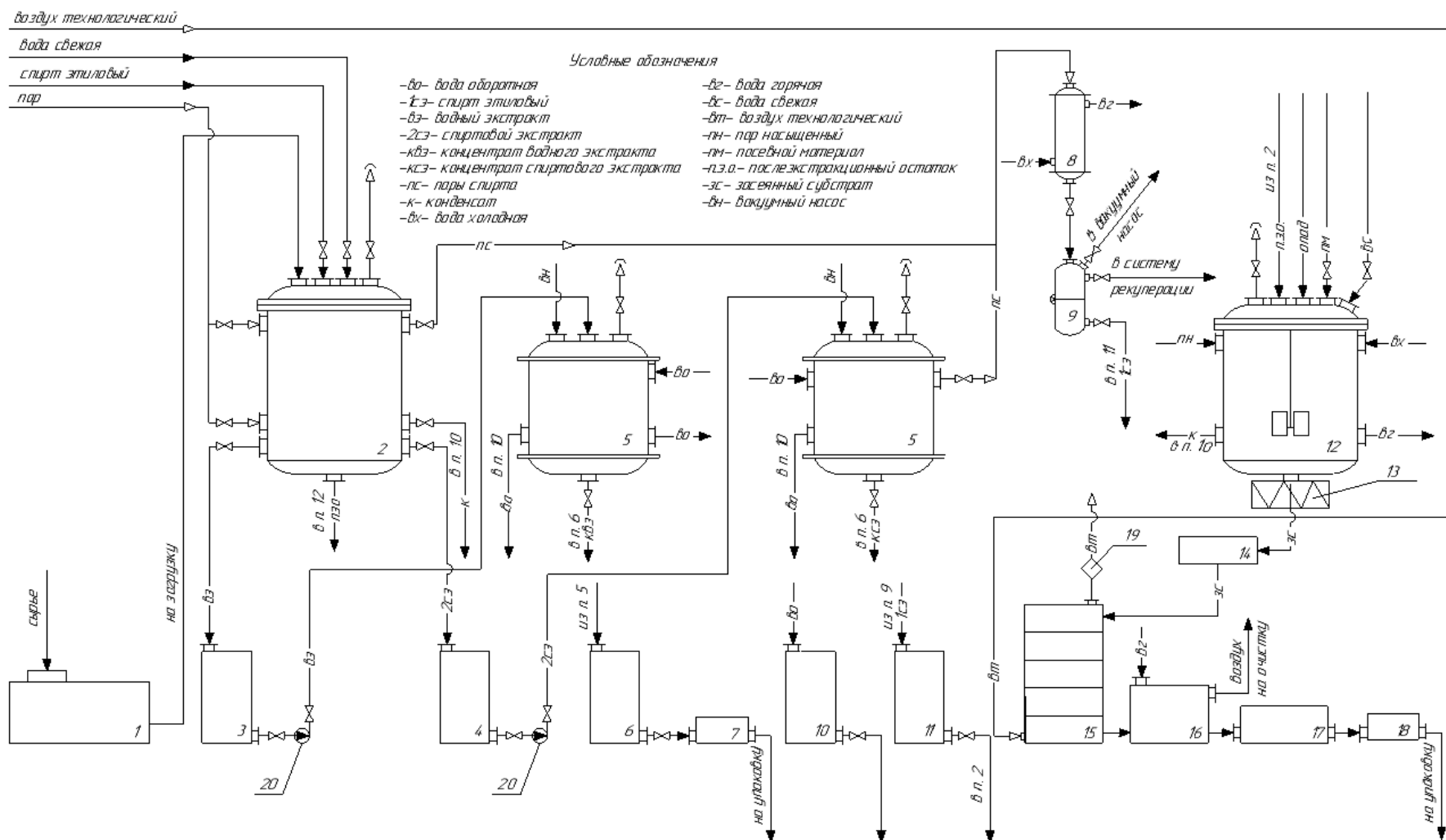


Рисунок 4.1 – Блок-схема технологического процесса переработки листьев тополя



1 – агрегат сушки-измельчения; 2 – экстрактор; 3 – сборник для водного экстракта; 4 – сборник для спиртового экстракта; 5 – вакуум выпарная установка; 6 – сборники концентратов; 7,18 – дозатор; 8 – конденсатор-холодильник; 9 – вакуумный приемник; 10 – сборник обратной воды; 11 – сборник этилового спирта; 12 – аппарат для смешивания; 13 – шнековый транспортер; 14 – лотки для твердофазного культивирования; 15 – растительная камера; 16 – сушильный шкаф; 17 – дезинтегратор; 19 – воздушный фильтр; 20 – насос

Рисунок 4.2 – Технологическая схема переработки листьев

представляет собой цилиндрическую емкость. Корпус резервуара оснащен автоматическим вращающимся шаровым распылителем СІР-очистки, отверстием для измерения температуры, взрывозащищенным смотровым фонарем, смотровым стеклом, быстро открывающимся загрузочным портом и т. д. Экстрактор обеспечивает простоту эксплуатации и соответствует стандартам GMP (Good Manufacturing Practice; Надлежащая производственная практика). Внутренний цилиндр оборудования изготовлен из импортной стали SUS304, кожух изолирован полностью закрытым алюмосиликатным покрытием, а внешний цилиндр декорирован матовой стальной пластиной SUS304.

В экстракторе осуществляются следующие операции: загрузка сырья, экстрагирование водой (продолжительность – 3 ч, отношение массы сырья к массе воды 1:20), слив водного экстракта, и экстракция твердого остатка этиловым спиртом (продолжительность – 3 ч, отношение массы сырья к массе растворителя 1:20, концентрация этилового спирта – 96 %), слив спиртового экстракта, отдувка паром твердого остатка, охлаждение и выгрузка отработанного сырья из экстрактора. В процессе отдувки пары этанола направляются в конденсатор-холодильник (8), где конденсируются и отправляются на регенерацию спирта.

Общая продолжительность экстрактооборота составляет – 8 ч.

Далее полученные экстракты по трубопроводу направляются в вакуум выпарные установки (5). Вакуум выпарная установка представляет собой герметичный цилиндрический котел из нержавеющей пищевой стали, оснащенный тепловой рубашкой с теплоносителем, запорной арматурой, средствами измерений температуры и давления внутри емкости, трубчатым теплообменником, вакуумным баком для выпаренной влаги, смотровым стеклом с подсветкой.

Сверху на вакуум выпарной установке расположен герметичный вакуумный люк, на котором находятся следующие элементы:

- электроконтактный мановакуумметр;
- патрубок подключения трубы подачи вакуума с шаровым краном и обратным клапаном;
- патрубок с шаровым краном для снятия вакуума перед открытием люка.

Защита водяной рубашки от избыточного давления обеспечивается группой безопасности в составе аварийного клапана на 0,15МПа, воздухоотводчика и манометра.

Далее концентрированные экстракты (упаренные в два раза) через сливной патрубков, находящийся в нижней части установки, сливаются в соответствующие сборники для водного и спиртового экстрактов (6). Из сборников экстракты поступают на пневматический поршневой дозатор ПД-2ПН (7), с помощью которого фасуются в канистры по 1 л и отправляются на склад готовой продукции.

Полученный в процессе концентрирования водного экстракта конденсат отправляется в сборник оборотной воды (10) для хранения и повторного использования. При концентрировании спиртового экстракта конденсат отправляется на регенерацию этанола (8) а затем в сборник для хранения (11) и дальнейшего использования этанола.

Полученный в процессе экстрагирования зеленых листьев твердый остаток смешивается с опадом тополя (соотношение 1:1 по массе) и поступает на микробиологическую обработку, где используются в качестве субстрата для получения биопрепарата типа «Триходермин» (продуцент – штамм К6-15 *Trichoderma spp.*), либо белкового кормового продукта (продуцент – штамм РР-3.2 *Pleurotus pulmonarius*) методом поверхностного твердофазного культивирования.

Технологический процесс производства биопрепаратов состоит из следующих стадий:

- получение чистой культуры гриба в лабораторных условиях;
- приготовление посевного материала;
- твердофазное культивирование грибов на растительном субстрате;
- сушка и измельчение ферментированного субстрата.

На стадии получения чистой культуры осуществляется подготовка и стерилизация питательной среды. Чистые культуры хранятся на предприятии в пробирках на скошенных агаризованных средах. Культуры периодически проверяют на микробиологическую чистоту и биохимическую активность.

Получение посевного материала грибов проводят глубинным способом культивирования. Для культивирования РР-3.2 *P.pulmonarius* используется среда Норкранса, для К6-15 *Trichoderma spp.* – среда Чапека (глюкоза – 30 г, NaNO_3 – 3 г, MgSO_4 – 0,5 г, FeSO_4 – 0,01 г, KH_2PO_4 – 1 г, KCl – 0,5 г, вода – 1 л). Вначале культуры выращивают в колбах в шейкере-инкубаторе. Далее засев осуществляют в биореакторы с постепенным увеличением объема.

Послеэкстракционный остаток и измельченный до 5-6 мм опад подаются в аппарат с лопастной мешалкой (12), где сырье перемешивается, увлажняется, стерилизуется и охлаждается до температуры $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$. Стерилизация осуществляется насыщенным паром при давлении 1 МПа в течение 60 мин. Выраженный в отделении чистой культуры посевной материал по стерильному трубопроводу подается в аппарат при непрерывном перемешивании. Конечная влажность субстрата составляет 65-70 %.

Затем засеянный субстрат с помощью шнекового транспортера (13) выгружается в перфорированные лотки (14) объемом $0,02 \text{ м}^3$ (слоем не более 8 см), которые составляются на этажерки (высота 2 м) в специальные климатические камеры для выращивания грибов (15), где поддерживается влажность 65-70 % и соответствующая для гриба температура.

Для получения биопрепарата типа «Триходермин» штамм К6-15 *Trichoderma spp.* вносится из расчета $1 \cdot 10^6$ спор/г а.с.с., температура культивирования $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Для получения белкового продукта мицелий продуцента РР-3.2 *P. pulmonarius* носится в субстрат в соотношении 1:10 по массе, температура культивирования $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$.

По истечении 10 сут культивирования полученный продукт высушивают в сушильных шкафах с принудительной вентиляцией (16) до остаточной влажности 10 %, измельчают на дезинтеграторе (17), фасуют на весовом дозаторе (18) в мешки по 3 кг, упаковывают и отправляют на склад готовой продукции.

Оборудования и трубопроводы, используемые для получения биопрепаратов, стерилизуются с помощью безразборной стерилизации или стерилизации «на

месте» (система SIP). Для стерилизации применяется острый пар с температурой 120 °С и давлением 0,2 МПа в течение 70 мин.

Очистка и стерилизация воздуха. В производстве требуется очистка как подаваемого в производственные аппараты и помещения, так и удаляемого из них воздуха, так как в воздухе может содержаться споры или клетки микроорганизмов.

При поверхностном культивировании подготовка воздуха для аэрации проводится в отделении кондиционирования воздуха. Отделение располагается над климатическими (растильными) камерами. Процесс состоит из следующих операций: очистка воздуха от грубых механических взвесей; предварительное кондиционирование воздуха до определенной температуры; подача воздуха в головной вентилятор; тонкая очистка воздуха от микроорганизмов и окончательная очистка в индивидуальном фильтре. Отходящий из растильных камер воздух (90 %) поступает на рециркуляцию через индивидуальный кондиционер, а остальные 10 % после предварительного прохождения системы фильтров и возвращается в атмосферу.

Особо высокие требования к стерильности предъявляются при подготовке воздуха для аэрации глубинной культуры. Для сжатия и нагнетания воздуха используется турбокомпрессор. Сжатие воздуха сопровождается его сильным нагреванием, поэтому после компрессора воздух поступает в холодильник. Для выравнивания давления в системе и обеспечения равномерной подачи воздуха на фильтры перед фильтрами устанавливают одну большую емкость – ресивер. Далее воздух подается в головной, а затем в индивидуальные фильтры. Воздух, отводимый из ферментёра после аэрирования культуры, также очищается в системе фильтров и выбрасывается в атмосферу.

Для получения стерильного воздуха используют следующие фильтрующие устройства: для предварительной очистки воздуха, для стадии грубой очистки (головные фильтры) и для стерилизации воздуха (индивидуальные фильтры). На стадии предварительной очистки или обеспыливания воздуха используются масляные фильтры, на стадии глубокой очистки – фильтрующий материал из базаль-

товых волокон, на стадии тонкой очистки – тонковолокнистые фильтрующие материалы.

Таким образом, данная схема переработки листьев тополя позволяет получить ряд продуктов (водный экстракт, спиртовой экстракт, белковый кормовой продукт и биопрепарат типа «Триходермин»), основные характеристики приведены в таблицах 4.2-4.4.

Таблица 4.2 – Характеристика спиртового экстракта листьев тополя бальзамического

Наименование показателя	Значения	
	водный экстракт	спиртовой экстракт
Внешний вид и цвет	Жидкость зеленого цвета	
Запах	Характерный тополиный	
Экстрактивные вещества, %	не менее 25	не менее 25
Флавоноиды, % от суммы экстрактивных веществ	-	не менее 40

Таблица 4.3 – Характеристика биопрепарата

Наименование показателя	Значение
Титр спор, КОЕ/г	до $2,1 \cdot 10^9$
Содержание гуминовых веществ, %	не менее 13
Влажность, %	не менее 10

Таблица 4.4 – Характеристика белкового кормового продукта

Наименование показателя	Значение
Белок, %	не менее 20
Влажность, %	не менее 10
Содержание нуклеиновых кислот, %	не более 1
Содержание тяжелых металлов	не превышает предельно допустимой концентрации [225]
Перевариваемость, %	не менее 50
Содержание клетчатки, %	15-26

Полученные продукты переработки листьев тополя возможно использовать в сельском хозяйстве. Водный экстракт листьев тополя применим для роста-стимулирования растений, спиртовые экстракты и биопрепарат типа «Триходермин» – для защиты растений от вредителей, также биопрепарата может быть использован для гумификации почвы. Кормовой продукт, полученный в результате биоконверсии листьев тополя, возможно использовать в рационе сельскохозяйст-

венных животных, как дополнительный источник белка.

4.2 Основные технико-экономические показатели производства

Для оценки экономической эффективности процесса проведены ориентировочные технико-экономические расчеты. Расчеты приведены для производства по переработке 100 т зеленых листьев и 64 т опада в год. Из данного объема перерабатываемого растительного сырья возможно получение следующих препаратов:

- водный экстракт – 1000,017 т;
- спиртовой экстракт – 800,021 т;
- биопрепарат типа «Триходермин» – 57,598 т;
- белковый кормовой продукт (БКП) – 63,998 т.

Численность работающих на предприятии составляет 49 человек. Заработная плата (ЗП) рабочих с учетом страховых взносов (30 %), затрат на охрану труда и технику безопасности (ТБ) (10 %) составляет 20,97 млн руб. Затраты на закупку растительного сырья составляют 100 тыс. руб. за 1 т. Затраты на технологическое оборудование, контрольно-измерительные приборы, инструменты, инвентарь и пр. составляют 42,076 млн руб. (сумма амортизационных отчислений 4,4 млн рублей).

Для расчета себестоимости продуктов учитывались расходы на воду, электроэнергию, затраты на сырье, ЗП, тара для фасовки, цеховые, общезаводские и внепроизводственные расходы. Расчеты прибыли от реализации и основные технико-экономические показатели представлены в таблице 4.5, 4.6.

Проведенные расчеты показывают, что переработка листьев тополя бальзамического является целесообразной и экономически выгодной. Данное производство предполагается разместить на площадях предприятия по переработке древесины тополя. В настоящее время новой энергетической сырьевой базой могут выступать быстрорастущие плантации тополей. Древесину тополя применяют в целлюлозно-бумажной и химической промышленности, в строительстве, в качестве заменителя цветных металлов, в спичечном и фанерном и мебельном произ-

Таблица 4.5 – Расчет прибыли от реализации продукции

Наименование продукции	По полной себестоимости			По оптовым ценам		Прибыль, млн руб.
	количество	себестоимость, руб.	сумма, млн руб.	цена, руб.	сумма, млн руб.	
Водный экстракт, л	1000017	38,021	38,022	400,0	400,007	361,985
Спиртовой экстракт, л	800020,5	401,92	321,544	700,0	560,014	238,470
Трихoderмин, кг	57597,8	245,876	14,162	500	28,799	14,637
Белковый кормовой продукт, кг	63997,5	216,53	13,857	320,0	20,479	6,622
Итого			387,585		1009,299	621,714

Таблица 4.6 – Основные технико-экономические показатели

Показатель	Величина
Полная себестоимость годового выпуска, млн руб.	387,585
Прибыль от реализации продукции, млн руб.	1009,299
Чистая прибыль, млн руб.	497,371
Рентабельность производства, %	49,3
Срок окупаемости, г	1

водстве. Высадка плантаций тополей одно из наиболее перспективных направлений, которое позволяет решить проблему социально-экономического развития лесных территорий.

Кроме того, создание производства возможно при объединении с трестом зеленого строительства муниципального образования, который проводит обрезку тополей, а также с управляющими компаниями, которые собирают опавшие листья с городских территорий. Это позволит решить проблему утилизации растительного сырья, создать новые рабочие места и новый источник дохода при относительно малых капитальных вложениях.

Выводы по главе 4

- разработанная технология опытного производства позволяет переработать 100 т зеленых листьев тополя, которые являются отходами производства древеси-

ны, а также образуется при их обрезке и 64 т опавших листьев, собранных на территории города;

- в основе разработки технологии опытного производства лежат результаты экспериментов по изучению состава и свойств экстрактивных веществ и твердофазного культивирования штаммов K6-15 *Trichoderma spp.* и PP-3.2 *Pleurotus pulmonarius*;

- при переработке 164 т листьев возможно получить 1000,0 т водного экстракта, 800,0 т спиртового экстракта, 57,6 т биопрепарата типа «Триходермина» ($2,1 \cdot 10^9$ КОЕ/г), 63,9 т белкового кормового продукта (содержание белка не менее 20,0 %). Рентабельность производства составляет 49,3 %, ориентировочный срок окупаемости до одного года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Обоснованы технологические решения, позволившие впервые разработать и апробировать способ комплексной химической и микробиологической переработки листьев тополя бальзамического с получением экстрактивных веществ, обладающих биологической активностью, и лигноуглеводных остатков с получением продуктов с добавленной стоимостью.

2. Методами химического и физико-химического анализа установлено наличие белков, углеводов, липидов, фенольных веществ, терпенов, макро- и микроэлементов, которые в совокупности определяют свойства и направление использования экстрактов из листьев тополя.

3. Получены новые сведения о ростостимулирующих и фунгицидных свойствах экстрактов листьев тополя бальзамического. Установлено, что при обработке водным экстрактом семян сосны обыкновенной увеличивается всхожесть (в 2,3 раза), длина проростков (1,9 раза) и корня (в 1,3 раза). Спиртовые экстракты листьев и его отдельные фракции подавляют рост и развитие грибов рода *Penicillium* зараженных семян мягкой яровой пшеницы сорта Новосибирская 31.

4. Установлен состав продуктов, полученных в результате конверсии листьев тополя базидиальными грибами. Продукт имеет высокий уровень белка (до 25-30 %), включающего от 51 до 87 % незаменимых аминокислот; содержит витамины, биологически ценные элементы, клетчатку (15-22 %), менее 1 % нуклеиновых кислот. Продукт нетоксичен, перевариваемость более 50 %, что позволяет рекомендовать его в качестве белковой кормовой добавки для сельскохозяйственных животных.

5. Определены условия культивирования базидиальных грибов на листьях тополя, обеспечивающие высокий выход продукта: крупность сырья 5-6 мм (РР-3.2 *P. pulmonarius*) и 7-8 мм (Fr5-15 *F. pinicola*); температура (25±2) °С; продолжительность культивирования 8-10 сут. Установлено, что под действием ферментного комплекса грибов деструкции подвергаются как полисахариды, так и лигниновые вещества. В большей степени грибы утилизируют водозэкстрактивные

вещества (до 56 %), легкогидролизуемую часть полисахаридов (до 36 %), в меньшей – лигниновые вещества (9-18 %).

6. С использованием сибирских штаммов М99-9 *Trichoderma aspirellum* и К6-15 *Trichoderma spp.* получен препарат с высоким титром (до $3,4 \cdot 10^9$ КОЕ/г), соответствующий нормам для биопрепарата типа «Триходермин». Процесс деструкции лигноуглеводного комплекса сопровождается образованием до 22 % гуминовых кислот. Установлено, что при внесении биопрепарата (на основе К6-15 *Trichoderma spp.* с титром не менее $7,1 \cdot 10^8$ КОЕ/г) в почву улучшается всхожесть семян и снижается их зараженность. Кроме того препарат возможно использовать для гумификации почвы.

7. Проведенные технико-экономические расчеты показали экономическую целесообразность комплексной переработки листьев тополя бальзамического по разработанной схеме. Рентабельность производства 49,3 %, ориентировочный срок окупаемости до одного года.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Scaysbrook, T. Relation of antimicrobial compounds present in poplar bud exudates to disease resistance by poplars / T. Scaysbrook, W. Greenway, F. R. Whatley // Z. Naturforsch. – 1992. – V. 47. – P. 197-200. – direct text.

2 Isidorov, V. A. GC-MS analyses of compounds extracted from buds of *Populus balsamifera* and *Populus nigra* / V. A. Isidorov, V. T. Vinogorova. // Z. Naturforsch. – 2003. – № 58 (5-6). – P. 355-360. – direct text.

3 Wollenweber, U. Novel caffeic acid derivatives and other constituents of *Populus* buds excretion and propolis (bee-glue) / U. Wollenweber, D. Asarawa, E. A. Scnillo // Z. Naturforschung. – 1987. – V. 42. – № 9/10. – P. 1030-1034. – direct text.

4 Pietarinen, S. P. Aspen knots, a rich source of flavonoids / S. P. Pietarinen, S. M. Willfor, F. A. Vikstrom // J. Wood chemistry and technology. – 2006. – V. 26. – P. 245-258. – direct text.

5 Поляков, В. В. Биологически активные соединения растений *Populus* L. и препараты на их / В. В. Поляков, С. М. Адекенов. – Алматы : Гылым, 1999. – 160 с. – Текст : непосредственный.

6 Браславский, В. Б. Антимикробная активность экстрактов и эфирных масел почек некоторых видов *Populus* L. / В. Б. Браславский, В. А. Куркин, И. П. Жданов. – Текст : непосредственный // Растительные ресурсы. – 1991. – Т. 27, вып. 2. – С. 77-81.

7 Исаева, Е. В. Состав, свойства и переработка отходов вегетативной части тополя после извлечения экстрактивных веществ. Сообщение 1. Химический состав твердых и жидких отходов / Е. В. Исаева, Т. В. Рязанова. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2012. – № 3. – С. 59-65.

8 Костина, Н. Е. Выделение, характеристика и противовирусные свойства биологически активных веществ из высших грибов Западной Сибири / Н. Е. Кос-

тина, Ж. Б. Ибрагимова, М. А. Проценко. – Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – С. 25-26.

9 Кочерова, А. В. Скрининг микромицетов – продуцентов лигнинолитических продуцентов ферментов / А. В. Кочерова. – Текст : непосредственный // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: сб. ст. всерос. науч.-практ. конф. – Красноярск : СибГТУ, 2013. – Т. 2. – С. 49-50.

10 Дворнина, А. А. Базидиальные съедобные грибы в искусственной культуре / А. А. Дворнина. – Кишинев : Штиица, 1990.–109 с. – Текст : непосредственный.

11 Кудря, А. М. Биоконверсия растительных отходов при промышленном производстве грибов рода *Pleurotus* : специальность 03 00 23 «Биотехнология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Кудря Алексей Михайлович ; Кубанский государственный аграрный университет. – Краснодар, 2007. – 155 с. – Текст : непосредственный.

12 Алимова, Ф. К. Некоторые вопросы применения препаратов на основе грибов рода *Trichoderma* в сельском хозяйстве / Ф. К. Алимова. – Текст : непосредственный // Журнал Агро XXI. – 2006. – № 4-6. – С.18-21.

13 FAO : website / Global Forest Resources Assessment 2020 – Key findings. Rome. URL: <https://doi.org/10.4060/ca8753en> (accessed on 15.11.2020). – Text : electronic.

14 Указ Губернатора Красноярского края № 332-уг от 21.12.2018 г. «Об утверждении лесного плана Красноярского края». Введ. 01.01.2019. Красноярск, 2018. – С. 73. – URL : <http://docs.cntd.ru/document/550303431> (дата обращения 15.11.2020). – Текст: электронный.

15 Морозов, В. И. Использование потенциальных ресурсов древесной зелени хвойных пород лесов Красноярского края / В. И. Морозов, Н. А. Петрушева. – Текст : непосредственный // Тенденции развития науки и образования. – 2019 – № 50-2. – С. 38-41.

16 Лесная отрасль Красноярского края : сайт. – URL : https://www.lesindustry.ru/issues/li_n69-70/Lesnaya_otrasl_Krasnoyarskogo_kra-ya_806/ (дата обра-

щения 15.11.2020). – Текст: электронный.

17 Речкина, Е. А. Выделение пектиновых веществ из древесной зелени сосны обыкновенной / Е. А. Речкина, Г. А. Губаненко, Л. П. Рубчевская. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2010. – № 4. – С. 189-190.

18 Чистова, Н. Г. Комплексное использование древесины / Н. Г. Чистова, Г. С. Миронов. – Красноярск : СибГТУ, 2011. – С. 226, ISBN 978-5-8173-0503-6. – Текст : непосредственный.

19 Испытания клонов гибридных тополей и осины на плантациях в условиях Северо-Запада России / А. В. Жигунов, И. А. Маркова, А. А. Григорьев, Г. Вюхлиш [и др.]. – Текст : непосредственный // Известия ЛТА. – 2013. – № 205. – С. 16-24.

20 Жигунов, А. В. Создание плантаций гибридных тополей и осин в Ленинградской области на постагrogenных землях / А. В. Жигунов, Д. А. Данилов, Р. Р. Зарипов. – Текст : непосредственный // Развитие земледелия в Нечерноземье: проблемы и их решение: сб. трудов по итогам междунар. науч.-практ. конф. – Санкт-Петербург – Пушкин : ФГБНУ «Ленинградский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Белогорка», 2016. – С. 157-161.

21 Сарсекова, Д. Н. Оценка пригодности почв для создания промышленных плантаций тополей на Юго-Востоке Казахстана / Д. Н. Сарсекова, Р. Х. Рамазанова. – Текст : непосредственный // Theoretical and experimental aspects of revealing and solving the current issues of fundamental sciences. Main trends in development of scientific and technical mechanisms able to satisfy the society's industrial and architectural engineering needs : Peer-reviewed materials digest (collective monograph) published following the results of the CXLIII International Research and Practice Conference and I stage of the Championship in Physics and Mathematics, Chemistry, Earth and Space Sciences, CXLIV International Research and Practice Conference and I stage of the Championship in Technical sciences, Architecture and Construction, London (26-29 мая 2017 г.) – London: Международная академия наук и высшего образования, 2017. – С. 16-19.

22 Царев, А. П. Многообразие использования древесины тополей /

А. П. Царев // Известия ВУЗов. Лесной журнал. – 2018. – № 5 (365). – С. 48-64. –
Doi 10.17238/issn0536-1036.2018.5.48.

23 Царёв, А. П. Сортоведение тополя / А. П. Царёв. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 1985. – 152 с. – Текст : непосредственный.

24 Браславский, В. Б. Ива, тополь и прополис в медицине и фармации: монография / В. Б. Браславский. – Самара : ООО «Офорт», 2012. – 116 с. – Текст : непосредственный.

25 Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения РАН «Тополь бальзамический». – URL : <http://www.bot-sad.ru> (дата обращения 15.11.2020). – Текст : электронный.

26 Комарова, В. Л. Флора СССР Т. 5 / В. Л. Комарова. – Москва : Изд-во АН СССР, 1936 – 396 с. – Текст : непосредственный.

27 Авдеева, Е. В. Зеленые насаждения городов Сибири : монография / Е. В. Авдеева. – Красноярск : СибГТУ, 2000 – 150 с. – Текст : непосредственный.

28 Рунова, Е. М. *Populus balsamifera* в озеленении Братска / Е. М. Рунова, Л. В. Аношина – Текст : непосредственный // Системы. Методы. Технологии. – 2014. – № 4 (24). – С. 141-143.

29 Аношкина, Л. В. Оптимизация размещения зеленых насаждений в городской среде / Л. В. Аношкина // Труды Братского государственного университета. Сер. Естественные и инженерные науки – развитию регионов Сибири. – 2010. – Т. 1. – С. 303-307 – Текст : непосредственный.

30 Тарасова, О. В. Экосистемы в городской среде: структура, состояние, устойчивость, управление: учебное пособие // О. В. Тарасовой. – Красноярск : Сиб. Федер. Ун-т, 2013. – 204 с. – Текст : непосредственный.

31 Коропачинский, И. Ю. Древесные растения для озеленения Красноярска / И. Ю. Коропачинский, Р. И. Лоскутов. – Новосибирск : Академическое издательство «Гео», 2014 – 320 с. – Текст : непосредственный.

32 Гроздова, Н. Б. Деревья, кустарники и лианы / Н. Б. Гроздова, В. И. Некрасова, Д. А. Глоба-Михаленко. – Москва : Лесная промышленность, 1986. – 349 с. – Текст : непосредственный.

33 Швейкина, Т. Г. Некоторые аспекты устойчивости тополя бальзамического в связи с интродукцией в промышленных зонах Урала / Т. Г. Швейкина // Промышленная ботаника: состояние и перспективы развития : тез. докл. респ. науч. конф., посвященной 25-летию Донецкого ботанического сада АН УССР. – Киев : Наукова думка, 1990. – 241 с. – Текст : непосредственный.

34 Анненковъ, Н. И. Ботаническій словарь / Н. И. Анненковъ. – Санкт-Петербург : Имп. Академія наукъ, 1878. – 267 с. – Текст : непосредственный.

35 Жизнь растений: «Семейство ивовых». – URL : <http://molbiol.ru>. (дата обращения 15.11.2020). – Текст : электронный.

36 Лотова, Л. И. Ботаника: Морфология и анатомия высших растений / Л. И. Лотова. – Изд. 4-ое, доп. – Москва : Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010. – 512 с. – Текст : непосредственный.

37 Kauter, D. Quantity and quality of harvestable biomass from *Populus* short rotation coppice for solid fuel use – A review of the physiological basis and management influences / D. Kauter, I. Lewandowski, W. Claupein // Biomass Bioenergy – 2003. – № 24. – P. 411-427. – direct text.

38 Yield and spatial supply of bioenergy poplar and willow short-rotation coppice in the UK / M. J. Aylott, E. Casella, I. Tubby, N. R. Street [et al.] // New Phytol. – 2008. – № 178 – P. 358-370. – direct text.

39 Исаева, Е. В. Состав, свойства и переработка отходов вегетативной части тополя после извлечения экстрактивных веществ. Сообщение 2. Получение белковых кормовых добавок на основе гидролизатов вегетативной части тополя бальзамического / Е. В. Исаева, Т. В. Рязанова. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2014. – № 3. – С. 233-238.

40 Браславский, В. Б. Комплексное фармакогностическое и физико-химическое исследование флавоноидов и фенилпропаноидов представителей семейства ивовых (*Salicaceae*) : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / Браславский Валерий Борисович ; Место защиты: Самарский го-

сударственный медицинский университет. – Самара, 2012. – 319 с. – Текст : непосредственный.

41 Биологическая активность экстрактов и эфирных масел почек тополя бальзамического Красноярского края / Е. В. Исаева, Г. А. Ложкина, Ю. А. Литовка, Т. В. Рязанова. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2008. – №1. – С. 67-72.

42 Патент № 2322501 Российской Федерации, МПК C12P 1/02 (2006.01), C11B 1/10 (2006.01), C11B 9/02 (2006.01), C11C 1/00 (2006.01), C09F 1/00 (2006.01). Способ комплексной переработки вегетативной части тополя бальзамического: № 2006124142/13 : заявл. 05.07.2006 : опуб. 20.04.2008 / Ложкина Г. А., Исаева Е. В. – 6 с. – Текст : непосредственный.

43 Куркин, В. А. Почки тополя – перспективный источник антимикробных и противогрибковых лекарственных средств / В. А. Куркин, В. Б. Браславский, Г. Г. Запесочная // Традиционная медицина и питание : теоретические и практические аспекты : материалы Первого междунар. науч. конгресса. – Москва, 1994. – 172 с. – Текст : непосредственный.

44 Патент № 2135201 Российской Федерации, МПК A61K 35/78. Способ получения настойки тополя для лечения гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей: № 98101655/14 : заявл. 20.01.1998 : опуб. 27.08.1999 / Куркин В. А., Браславский В. Б., Запесочная Г. Г., Правдивцева О. Е., Жданов И. П., Косякин В. А., Ткаченко А. А. – 6 с. – Текст : непосредственный.

45 Патент № 2236242 Российской Федерации, МПК A 61 K 35/78, A 61 P 31/04. Фитопрепарат с антимикробным ранозаживляющим действием для лечения животных: № 2001134708/15 : заявл. 24.12.2001 : опуб. 20.09.2004 / Тетерев И. И., Ступников С. Г. – 6 с. – Текст : непосредственный.

46 Поляков, В. В. Масло тополя бальзамического (*Populus balsamifera*) и производные мирицетина, обладающие биологической активностью : специальность 02.00.10 «Биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ» : автореферат диссертации доктора химических наук / Поляков Владилен Васильевич ; Северо-Казахстанский университет, Институт фитохимии

МН-ВО РК, Казахский государственный национальный университет аль-Фараби. – Караганда, 1999. – 55 с. – Место защиты: Институт органического синтеза и углехимии МН-ВО Республики Казахстан. – Текст : непосредственный.

47 Клишина, И. И. Исследование противомикробного действия экстракта почек тополя черного и мази на его основе / И. И. Клишина, Н. В. Никитина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. – Пятигорск, 2010. – С. 454-455. – ISBN 978-5-94122-068-7. – Текст : непосредственный.

48 Никитина, Н. В. Разработка дерматологической мази с экстрактом почек *Populus nigra* / Н. В. Никитина, С. Н. Степанюк. – Текст : непосредственный // Науч. ведомости БелГУ. Сер. Мед. Фармация. – 2010. – № 11. – С. 120-127. – ISSN 1990-5327.

49 Исаева, Е. В. Комплексная переработка вегетативной части тополя бальзамического с получением биологически активных продуктов : специальность 05.21.03 «Технология и оборудование химической переработки биомассы дерева; химия древесины» : автореферат диссертации доктора технических наук / Исаева Елена Владимировна ; Сибирский государственный технологический университет. – Красноярск, 2008. – 43 с. – Место защиты: Сибирский государственный технологический университет. – Текст : непосредственный.

50 Бурдейная, Т. М. Вегетативная часть тополя как сырье для получения биологически активных веществ / Т. М. Бурдейная., Е. В. Исаева. – Текст : непосредственный // Вестник СибГТУ. – 2002. – № 2. – С. 37–40.

51 Хромато-масс-спектрометрическое исследование летучих компонентов вегетативной части тополя бальзамического / Е. В. Исаева, Г. А. Ложкина, Т. В. Рязанова, А. И. Вялков [и др.]. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С.63-66.

52 Ложкина, Г. А. Исследование спиртового экстракта почек тополя бальзамического / Г. А. Ложкина, Е. В. Исаева, Т. В. Рязанова. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2009. – № 1. – С. 83-87.

53 Степень, Р. А. Основные направления рационального использования древесных отходов / Р. А. Степень, С. М. Репях, В. В. Шелепков. – Текст : непосредственный // Вестник СибГТУ. – 2001. – № 2. – С. 86–93.

54 Никитина, А. С. Экспериментальное обоснование состава и применения дерматологической мази с экстрактом *Populus nigra* / А. С. Никитина. // Интегративная медицина – 2010 : 5-й Междунар. форум. – Москва, 2010. – С. 188-189 . – ISBN 978-5-93055-178-5. – Текст : непосредственный.

55 Stronger antioxidant enzyme immunoreactivity of *Populus tomentiglandulosa* extract than ascorbic acid in rat liver and kidney / Ch. H. Lee, J. H. Park, J. H. Ahn [et al.] // Iran J Basic Med Sci. – 2019. – № 22. – P. 963-967. – Doi: 10.22038/ijbms.2019.34926.8296. – direct text.

56 *Populus balsamifera* Extract and Its Active Component Salicortin Reduce Obesity and Attenuate Insulin Resistance in a Diet-Induced Obese Mouse Model / D. Harbilas, D. Vallerand, A. Brault [et al.] // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume. – 2013. – URL: <https://doi.org/10.1155/2013/172537> (accessed on 15.11.2020). – direct text.

57 Pharmacological potential of *Populus nigra* extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent / N. Debbache-Benaid, D. Atmani-Kilani, V. Barbara Schini-Keirith [et al.] // Asian Pac J Trop Biomed. – 2013. – Vol. 3. – № 9. – P. 697-704. – direct text.

58 Дослідження ліпофільних сполук тополі китайської (*Populus simonii* Carr.) / А. М. Рудник [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармаком. – 2008. – № 3. – С. 21-28.

59 Antioxidant polyphenols from *Populus alba* growing in Georgia : научное издание / J. Kuchukhidze [et al.] // Georg. Med. News. – 2011. – № 10. – P94-97. – ISSN 1512-0112. – direct text.

60 Pobłocka-Olech, L. Anti-inflammatory and antioxidative effects of the buds from different species of *Populus* in human gingival fibroblast cells: Role of bioflavanones / L. Pobłocka-Olech, I. Inkielewicz-Stepniak, M. Krauze-Baranowska //

Phytomedicine. – 2019. – Vol. 56. – P. 1-9. – DOI: 10.1016/j.phymed.2018.08.015 – direct text.

61 Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effects on skin aging / S. Dudonne, P. Poupard, P. Coutiere [et al.] // J. Agric. Food. Chem. – 2011. – Vol. 59. – № 9. – P. 4527-4536. – doi: 10.1021/jf104791t. – direct text.

62 Phenolic glycosides as inhibitors of inducible nitric oxide synthase from *Populus davidiana* in LPS-activated RAW 264.7 murine macrophages / H. J. Lee, J. S. Kim, Y. K. Kim, J. H. Ryu // Pharmazie. – 2012. – № 67. – P. 870-873. – direct text.

63 Phenolic glycosides with antioxidant activity from the stem bark of *Populus davidiana* / X. Zhang, PT. Thuong, BS. Min [et al.] // J Nat Prod. – 2006. – № 69. – P. 1370-1373. – direct text.

64 Molecular mechanisms underlying the in vitro antiinflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from chinese propolis (poplar type) / K. Wang, S. Ping, S. Huang [et al.] // Evid Based Complement Alternat Med. – 2013. – P. 127672. – direct text.

65 Stronger antioxidant enzyme immunoreactivity of *Populus tomentiglandulosa* extract than ascorbic acid in rat liver and kidney / Ch. H. Lee, J. H. Park, J. H. Ahn [et al.] // Iran J Basic Med Sci. – 2019. – № 22. – P. 963-967. – Doi: 10.22038/ijbms.2019.34926.8296. – direct text.

66 Радиопротекторные свойства фитопрепарата «Тополин» / В. В. Поляков [и др.]. – Текст : непосредственный // Биоантиоксидант: 8-я Междунар. конф. – Москва, 2010. – С. 384-386. – ISBN 978-5-209-00871-9.

67 Поляков, В. В. Перспективы внедрения новых оригинальных препаратов на основе почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera*) / В. В. Поляков, А. Е. Альжанов. – Текст : непосредственный // Materials digest of the XXX International Research and Practice Conference and the II Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences. – 2012. – С. 105-108.

68 Поляков, В. В. Препараты из тополя бальзамического (*Populus balsamifera*), содержащие фенольные соединения и опыт их применения в медицине / В. В. Поляков, С. М. Адекенов, А. Е. Альжанов. – Текст : непосредственный // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. – Б.м., 2012. – С. 634-638. – ISBN 978-5-209-04571-7.

69 Медицинский портал : сайт «В Казахстане зарегистрировали препарат, который заменит антибиотики». – URL : <https://www.medcentre.com.ua/articles/V-Kazahstane-zaregistrirovali-preparat-43179> (дата обращения 15.11.2020). – Текст : электронный.

70 Бакулин, В. Т. Антимикробная активность листьев тополей и ив (*Salicaceae*) в Сибири / В. Т. Бакулин, Л. Н. Чиндяева, Н. В. Цыбуля. – Текст : непосредственный // Проблемы региональной экологии. – 2010. – № 6. – С. 60-64.

71 Цыбуля, Н. В. Антимикробная активность масляных экстрактов почек некоторых видов и форм тополя / Н. В. Цыбуля, Ю. Л. Якимова, В. Т. Бакулин. – Текст : непосредственный // Вестник ИРГСХА. – 2011. – № 44-4. – С. 136-140.

72 Ахметова, С. Б. Доклиническое изучение эфирного масла тополя бальзамического / С. Б. Ахметова, Д. Ю. Шмырева. – Текст : непосредственный // Современная фармация: проблемы и перспективы развития: материалы V межрегион. науч.-практ. конф. с междунар. участием. ГБОУ ВПО СОГМА Минздрава России; под редакцией Ф. Н. Бидаровой : Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова, 2015. – С. 392-395.

73 Исаева Е. В. Использование вегетативной части тополя в качестве биологической активной кормовой добавки / Е. В. Исаева, Т. М. Бурдейная, Т. В. Рязанова. – Текст : непосредственный // Лесной и химический комплексы – проблемы и решения: сб. ст. по материалам всерос. науч.-практ. конф. посвященной 80-летию СибГТУ. – Красноярск : СибГТУ, 2010. – Т. 2. – С. 23-26.

74 Худорожкова, О. А. Исследование химического состава листьев тополя бальзамического / О. А. Худорожкова, Г. А. Ложкина, Е. В. Исаева. – Текст : непосредственный. // Лесной и химический комплексы. Проблемы и решения: сб.

ст. всерос. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых. – Красноярск : СибГТУ, 2007. – Т. 2. – С. 39-42.

75 Исаева, Е. В. Групповой химический состав листьев тополя / Е. В. Исаева, Т. В. Рязанова Л. В. Гаврилова. – Текст : непосредственный. // Sciences of Europe (Praha, Czech Republic). – 2016. – Vol.1, N8(8). – P.116-121.

76 Найдено, Е. А. Фракционирование углеводов листьев тополя бальзамического / Е. А. Найдено, О. В. Шепелева, Е. В. Исаева. – Текст : непосредственный // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы VI всерос. конф. – Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2014. – С. 247-248.

77 Шепелева, О. В. Аминокислотный состав белков листьев тополя бальзамического / О. В. Шепелева, Е. В. Исаева. – Текст : непосредственный // Лесной и химико-лесной комплексы – проблемы и решения: сб. ст. всерос. науч.-практ. конф. – Красноярск : СибГТУ, 2014. – С. 191-194.

78 Растительные ресурсы СССР. – Ленинград : Наука, 1986. – 336 с. – Текст : непосредственный.

79 Куркин, В. А. Сравнительное исследование флавоноидного состава листьев фармакопейных видов рода *Populus* / В. А. Куркин, Е. А. Куприянова. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2020. – № 1. – С.117-124

80 Рецепт здоровья: сайт / «Тополь – лечебные свойства» URL: <http://recipehealth.ru/chem-lechim/topol-lechebnyiesvoyst-va.html> (дата обращения 15.11.2020). – Текст : электронный.

81 Русина, Л. М. Перспективы использования листьев тополя в качестве корма / Л. М. Русина, Н. С. Русин. – Текст : непосредственный // Проблемы использования, воспроизводства и охраны лесных ресурсов: сб. конф. (01 июня 1989 года). – Йошкар-Ола : Марийское книжное издательство, 1989. – С. 35-36.

82 Лобанова, И. Ю. Фенольные соединения листьев осины обыкновенной как основа создания препарата противовоспалительного действия / И. Ю. Лобанова. – Текст : непосредственный // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – №3/1. – С. 67-68.

83 Лобанова, И. Ю. Фитохимическое и технологическое исследование листьев осины обыкновенной: специальность 14.04.01 «Технология получения лекарств», 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Ирина Юрьевна Лобанова ; Место защиты: Пермская государственная фармацевтическая академия. – Пермь, 2012. – 228 с. – Текст : непосредственный.

84 Рассыпнова, С. С. Изучение противовоспалительного действия экстракта из коры *Populus tremula* (*Salicaceae*) и входящих в его состав фенольных соединений / С. С. Рассыпнова, В. Ф. Турецкова, Я. Ф. Зверев. – Текст : непосредственный // Растительные ресурсы. – 2010. – Т. 46, вып. 3. – С. 103-108.

85 Экстракты тополя бальзамического как регуляторы роста яровой мягкой пшеницы / Е. В. Калюта, М. И. Мальцев, О. В. Шепелева, Е. В. Исаева. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2017– № 4. – С. 203-209.

86 Патент № 2 699 978 Российская Федерация, МПК C05F 17/00, C09K 17/00, A01C 21/00. Способ приготовления состава посадочной почвы для автономного выращивания растений: № 2018146369 : заявл. 24.12.2018 : опуб. 11.09.2019 / Григорьев В. С. – 4 с. – Текст : непосредственный.

87 Патент № 2710997 Российская Федерация, МПК A01G 22/25, A01B 79/02. Способ выращивания моркови: № 2019115715 : заявл. 22.05.2019 : опуб. 14.01.2020 / Степанов В. А. – 7 с. : ил. – Текст : непосредственный.

88 Журнал профессионалов ЛПК : сайт / Пеллеты и брикеты из опавших листьев. – URL: <https://bio.ukr.bio/ru/articles/10825/> (дата обращения 21.09.2020). – Текст : электронный.

89 Получение целлюлозных волокон из опавших листьев карагача / А.Т. Таурбеков, Б.Б. Қайдар, Т.В. Черноглазова, З.А. Мансуров. – Текст : непосредственный. // Горение и плазмохимия. – 2020. – № 18. – С.141-148.

90 Мухин, В. А. Дереворазрушающие грибы – современная Экологическая Парадигма / В. А. Мухин. – Текст : непосредственный // Биоразнообразие и экология грибов и грибоподобных организмов Северной Евразии : Всерос. конф. с междунар. участием (20-24 апреля 2015 года). – Екатеринбург, 2015. – С. 170-173.

91 Дереворазрушающие свойства сибирских штаммов *Fomitopsis pinicola* (sw.) P. KARST / Ю. А. Литовка, И. Н. Павлов, Т. В. Рязанова, А.В. Газизулина [и др.]. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2018. – № 1. – С. 193-199.

92 Мухин, В. А. Структура флоры базидиальных дереворазрушающих грибов евразийской части Голарктики (СССР) / В. А. Мухин. – Текст : непосредственный // Микология и фитопатология. – 1978. – Т. 12, вып. 1. – С. 55–60.

93 Gilbertson, R. L. Wood-rotting fungi of North America / R. L. Gilbertson // Mycologia. – 1980. – V. 72, № 1. – P. 1–54. – direct text.

94 Ферментативная активность ксилотрофных базидиомицетов при твердофазном культивировании / Д. Ю. Ильин, Г.В. Ильина, Ю. С. Лыков, М. И. Морозова. – Текст : непосредственный // Нива Поволжья : Пензенский государственный аграрный университет. – Пенза, 2012. – С. 26-31. – ISSN: 1998-6092 2(12).

95 Hatakka, A. Biodegradation of lignin / A. Hatakka // Lignin, Humic Substances and Coal. Wiley-VCH, Germany, 2001. – P. 129-180. – direct text.

96 Hartig, R. Die Zersetzungsercheinungen des Holzes der Nadelholbaume und der Eiche in forstlicher botanischer und chemischer Richtung / R. Hartig. – Berlin, 1978. – 211 p. – direct text.

97 Возможность создания новых лекарственных препаратов на основе базидиальных грибов / А. С. Тренин, Н. Ю. Кац, Е. А. Цвигун [и др.]. – Текст : непосредственный // Биотехнология и качество жизни : Междунар. науч.-прак. конф. (18-20 марта 2014 года). – Москва, 2014. – С. 146-147.

98 Горшина, Е. С. «Трамелан» – отечественная биологически активная добавка на основе сухой биомассы лекарственного базидиомицета *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilat и другие препараты грибов рода *Trametes* / Е. С. Горшина. – Текст : непосредственный // Успехи медицинской микологии. – 2005. – Т. 5. – С. 262-266.

99 Соломко, Э. Ф. Анализ кинетики роста мицелия высшего базидиального гриба вешенки обыкновенной в глубинной культуре / Э. Ф. Соломко, И. П. Си-

ренко, О. А. Федоров. – Текст : непосредственный // Производство высших съедобных грибов в СССР. – Киев : Наукова думка, 1985. – С. 124-126.

100 Тарнопольская, В. В. Перспективы использования базидиальных грибов для получения кормовых продуктов / В. В. Тарнопольская, Е. В. Алаудинова, П. В. Миронов. – Текст : непосредственный // Хвойные бореальной зоны. – 2016. – № 37 (5-6). – С. 338-341. – ISSN: 1993-0135.

101 Мельникова, Е. А. Разработка технологии переработки растительного сырья методами глубинного и твердофазного культивирования *Pleurotus pulmonarius* с получением белковых кормовых продуктов : специальность 05.21.03 «Технология и оборудование химической переработки биомассы дерева; химия древесины» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук / Елена Александровна Мельникова ; Место защиты: Сибирский государственный технологический университет. – Красноярск, 2016. – 20 с. – Текст : непосредственный.

102 Dhaliwal, R. P. S. Regulation of lignocellulotic enzyme system in *Pleurotus ostreatus* / R. P. S. Dhaliwal, H. S. Garcha, P. K. Khanna // Indian J. Microbiol. – 1991. – № 31 (2). – P. 181-184. – direct text.

103 Singh, M. P. Biodegradation of lignocellulosic waste through cultivation of *Pleurotus sajor-caju* / M. P. Singh // In Science and Cultivation of Edible Fungi of the 15-19 May 2000. – Netherlands, 2020. – P. 517-521. – direct text.

104 Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review / S. J. A. Van Kuijk, A. S. M. Sonnenberg, J. J. P. Baars, W. H. Hendriks [et al.] // Biotechnol. Adv. – 2015. – № 33 (1). – P. 191-202. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.014> (accessed on 15.11.2020). – Text : electronic.

105 Pandey, V. K. Biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* / V. K. Pandey, M. P. Singh // Cell. Mol. Biol. – 2014. – № 60 (5). – P. 29-34. – Doi: 10.14715/cmb/2014.60.5.6. – direct text.

106 Marques de Souza, C. G. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid

state medium / C. G. Marques de Souza, R. M. Peralta // J. Basic Microbiol. – 2003. – № 43 (4). – P. 278-286. – DOI.org/10.1002/jobm.200390031. – direct text.

107 Biodegradation of Sugarcane bagasse by *Pleurotus citrinopileatus* / V. K. Pandey, M. P. Singh, A. K. Srivastava, S. K. Vishwakarma [et al.] // Cell. Mol. Biol. – 2012. – № 58(1). – P. 8-14. – DOI: 10.1170/T914. – direct text.

108 Biodegradation of Brassica haulms by white rot fungus *Pleurotus eryngii* / M. P. Singh, V. K. Pandey, A. K. Srivastava, S. K. Vishwakarma // Cell. Mol. Biol. – 2011. – № 57 (1). – P. 47-55. – direct text.

109 Mytopia: website / «Mytopia Mushrooms Products». – URL: <http://www.mytopia-mushrooms.com/products.htm> (accessed on 15.11.2020). – Text : electronic.

110 Stamets, P. Growing gourmet and medicinal mushrooms: a companion guide to The Mushroom Cultivator / by Paul Stamets. – 3rd ed. / P. Stamets. – Berkeley, California, USA: Ten Speed Press, 2000. – 1420 p. – ISBN 978-1-58008-175-7. – URL: <https://files.openpdfs.org/LbXgPvZb5ev.pdf#pdfjs.action=download> (accessed on 15.11.2020). – Text : electronic.

111 Свойства вешенки : сайт / Вред. Польза. – Москва, 2020 – URL: <https://vredpolza.ru/flora-fauna/item/185-veshenki-polza-i-vred.html> (дата обращения 15.11.2020). – Текст: электронный.

112 Antinociceptive Effects of (1→3),(1→6)-Linked β -Glucan Isolated From *Pleurotus pulmonarius* in Models of Acute and Neuropathic Pain in Mice: Evidence for a Role for Glutamatergic Receptors and Cytokine Pathways / C. H. Baggio, C. S. Freitas, D. F. Martins, L. Mazzardo [et al.] // The Journal of Pain. – 2010. – № 11 (10). – P. 965–971. – Doi:10.1016/j.jpain.2010.01.005. – direct text.

113 Antinociception of β -D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition / C. H. Baggio, C. S. Freitas, R. Marcon, M. F. P. Werner [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2011. – № 50 (3). – P. 872–877. – direct text.

114 Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies / I.

Lavi, D. Levinson, I. Peri, Y. Tekoah [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – № 85 (6) . – P. 1977–1990. – Doi:10.1007/s00253-009-2296-x. – direct text.

115 Interaction of Aqueous Extract of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel-Champ. with Glyburide in Alloxan Induced Diabetic Mice / S. L. Badole, N. M. Patel, P. A. Thakurdesai, S. L. Bodhankar // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2008. – № 5 (2). – P. 159-164. – Doi:10.1093/ecam/nem010. PMC 2396481. – direct text.

116 Glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* inhibit colitis-associated colon carcinogenesis in mice / I. Lavi, L. Nimri, D. Levinson, I. Peri // Journal of Gastroenterology. – 2011. – № 47 (5). – P. 504–518. – Doi:10.1007/s00535-011-0514-7. – direct text.

117 Ramesh, Ch. Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India / Ch. Ramesh, M. G. Pattar // Pharmacognosy Research. – 2010. – № 2 (2). – P. 107–112. – Doi:10.4103/0974-8490.62953. – direct text.

118 Chlebicki, A. *Fomitopsis officinalis* on Siberian larch in the Urals / A. Chlebicki, V. A. Mukhin, N. Ushakova // Mycologist. – 2003. – V. 17. – P. 116-120. – direct text.

119 Park, N. Purification and characterization of a novel laccase from *Fomitopsis pinicola* mycelia / N. Park, S. S. Park // Int. J. Biol. Macromol. – 2014. – V. 70. – P. 583-589. – direct text.

120 Перспективы глубинного культивирования *Fomitopsis pinicola* (sw.) Р. KARST на гидродинамически активированных растительных отходах / И. Н. Павлов, Ю. А. Литовка, Е. А. Литвинова, С. М. Петренко. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2020. – № 4. – С. 385-394.

121 Биотехнологический потенциал Сибирских штаммов базидиальных грибов – продуцентов ферментов лигноцеллюлазного действия / Ю. А. Литовка, И. Н. Павлов, П. В. Маколова, А. А. Тимофеев [и др.]. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2020. – № 4. – С. 371-383.

122 Rösecke, J. Steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola* / J. Rösecke, W. A. König // *Phytochemistry*. – 1999. – Vol. 52 (8). – P. 1621-1627. – [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00349-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00349-0) (accessed on 15.11.2020). – Text : electronic.

123 Investigating migration inhibition and apoptotic effects of *Fomitopsis pinicola* chloroform extract on human colorectal cancer SW-480 cells / Y. Wang, X. Cheng, P. Wang [et. al.] // *PLOS One*. – 2014. – V. 9, № 7. – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101303> (accessed on 15.11.2020). – Text : electronic.

124 Keller, A. C. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola* / A. C. Keller, M. P. Maillard, K. Hostettmann // *Phytochemistry*. – 1996. – Vol. 41, № 4. – P1041-1046 . – ISSN 0031-9422. – direct text.

125 Жилинская, Н. В. Штамм *Fomitopsis pinicola* (SW.) P. Karst. – перспективный источник противомикробных соединений / Н. В. Жилинская, Т. И. Громовых. – Текст : непосредственный // *Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук*. – 2014. – № 5. – С. 25-27.

126 Patent № 3858492 USA, IPC A23C 9/00, A23C 5/00, A23C 19100. Flavor enhancement of milk foodstuffs: filed 20.05.1971 : published 07.01.1975 / Masanobu K., Noboru M., Kabushiki K. H. K. – 5 p. – direct text.

127 Ломинина, Е. В. Изучение протеолитической активности высших базидиомицетов / Е. В. Ломинина. – Текст : непосредственный // *Фундаментальные науки и практика*. – 2010. – Т. 1, № 1. – С. 131-132.

128 Патент 2620078 Российской Федерации, МПК C12P7/64, C12N1/14. Штамм базидиомицета *Fomitopsis pinicola* ВКПМ F-1285 - продуцент липидов: № 2015156842 : заявл. 29.12.2015 : опубл. 22.05.2017 / Винокуров В. А., Барков А. В., Кожевникова Е. Ю., Альмяшева Н. Р. [и др.] : заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова" (МГУ) (RU). – 5 с. – Текст : непосредственный.

129 Schwarze, F. W. M. R. Fungal Strategies of Wood Decay in Trees / F. W. M. R. Schwarze, J. Engels, C. Mattheck. – Verlag-Berlin, Heidelberg : Springer, 2000. – 185 p. – direct text.

130 Бондарцев, А. С. Трутовые грибы европейской части России и Кавказа / А. С. Бондарцев. – Москва-Ленинград : Изд-во АН: СССР, 1953. – 1107 с. – Текст : непосредственный.

131 Бондарцева, М. А. Определитель грибов России. Афиллофоровые грибы / М. А. Бондарцева. – Ленинград : Наука, 1998. – 391 с. – Текст : непосредственный.

132 Атлас-определитель дереворазрушающих грибов лесов Русской равнины / В. Г. Стороженко, В. И. Крутов, А. В. Руколайнен, В. М. Коткова [и др.]. – Москва : Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 195 с. – Текст : непосредственный.

133 Баурин, Д. В. Исследование процесса биологического разложения растительных отходов микроскопическими грибами / Д. В. Баурин, Е. В. Николукина. – Текст : непосредственный // Успехи в химии и химической технологии. – 2009. – Т. 23, № 10 (103). – С. 77-79.

134 Алимова, Ф. К. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma* / Ф. К. Алимова. – Казань : Казан. гос. ун-т, 2006. – 209 с. – Текст : непосредственный.

135 Садыкова, В. С. Экология грибов рода *Trichoderma* (Pers: Fr.) бассейна реки Енисея, их биологические свойства и практическое использование. – URL : http://www.bio.msu.ru/res/Dissertation/426/DOC_FILENAME/sadi-kova.pdf (дата обращения 23.11.2020). – Текст : электронный.

136 Franco, P. F. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* Strain T4 / P. F. Franco, H. M. Ferreira, E. X. Filho // Biotechnol Appl Biochem. – 2004. – V. 6. – P. 32–40. – direct text.

137 Ташпулатов, Ж. Грибы рода *Trichoderma* Pers.: Fr. и их использование при переработке отходов растениеводства : специальность 03.02.03 «Микробиология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологии

ческих наук / Ж. Ташпулатов. – Москва : МГУ, 1987. – 45 с. – Текст : непосредственный.

138 Культивирование гриба *Trichoderma* на растительном сырье / Е. В. Скворцов, Ф. К. Алимова, Н. А. Соснина, В. Ф. Миронов. – Текст : непосредственный // Химия и компьютерное моделирование. – 2002. – № 7. – С. 57–60.

139 *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts / G. E. Harman [et al.] // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – V. 2, No 1. – P. 43-56. – direct text.

140 Алимова, Ф. К. Современная система *Trichoderma/Hypocrea* / Ф. К. Алимова. – Текст : непосредственный // Ученые записки Казанского государственного университета. Естественные науки. – 2005. – Т. 147, кн. 2. – С. 28-55.

141 Kubicek, C. P. *Trichoderma* and *Gliocladium*, basic biology, taxonomy and genetics / C. P. Kubicek, G. E. Harman. – London : Taylor and Francis, 1998. – V. 1. – 278 p. – direct text.

142 Генетическая изменчивость *Trichoderma harzianum* в почвах, загрязненных тяжелыми металлами. Систематика грибов и филогенетическая терминология / Ф. К. Алимова [и др.] // Современная микология в России: тез. докл. 1-го съезда микологов России. – Москва, 2002. – 161 с. – Текст : непосредственный.

143 Ферментативная активность мицелиального гриба *Trichoderma reesei* M18 при культивировании на питательной среде из целлюлозного торфа / С. В. Гаврилова [и др.]. – Текст : непосредственный // Лесной журнал. – 2016. – № 6(354). – С. 142-149.

144 Помозова, О. В. Оценка возможности использования штаммов *Trichoderma* для очистки сточных вод от фенола / О. В. Помозова, П. Н. Бондарь. – Текст : непосредственный // Экологическое образование и природопользование в инновационном развитии региона: сб. ст. межрегион. науч.-практ. конф. школьников, студентов, аспирантов и молодых ученых. – Красноярск : СибГТУ, 2013. – Т. 1. – С. 49-51.

145 Бондарь, П. Н. Оценка возможности использования штаммов *Trichoderma* для очистки сточных вод от моносинтетического фенола / П. Н. Бондарь //

Экологическое образование и природопользование в инновационном развитии региона: сб. ст. межрегион. науч.-практ. конф. школьников, студентов, аспирантов и молодых ученых. – Красноярск : СибГТУ, 2014. – Т. 1. – С. 164-166. – Текст : непосредственный.

146 Muthumeenakshi, S. Genandic comparison of the aggressive weedmold strains of *Trichoderma harzianum* from mushroom compost in North-America and the British-Isles / S. Muthumeenakshi, A. E. Brown, P. R. Mills // Mycological Research. – 1998. – V. 102, №. APR. – P. 385-390. – direct text.

147 *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus* / G. J. Samuels, S. L. Dodd, W. Gams, L. A. Castlebury [et al.] // Mycologia. – 2002. – V. 94. – P. 146-170. – direct text .

148 Schneider dandermination of fungal spore release from wand building materials / J. Kildes, H. Würtz, K. Nielsen, P. K. Kruse [et al.] // Indoor Air. – 2003. – V. 13, № 2. – P. 148. – direct text.

149 Clinical importance of the genus *Trichoderma* / L. Kredics, Z. Antal, I. Doczi, L. Manczinger [et al.] // A review Acta Microbiol Immunol Hung. – 2003. – V. 50, № 2–3. – P. 105-117. – direct text.

150 *Trichoderma* species –opportunistic, avirulent plant symbionts / G. E. Harman, C. R. Howell, A. Viterbo, I. Ch& [et al.] // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – V. 2, № 1. – P. 43-56. – direct text.

151 Гринько, Н. Н. Экологические аспекты регулирования популяций фитопатогенных микромицетов овощных культур в закрытом грунте : специальность 03.00.24 «Микология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Нина Николаевна Гринько ; Место защиты: Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. – Москва, 2001. – 37 с. – Текст : непосредственный.

152 The study the quarantine control and the methods of disinfection of tomato and cucumber seeds in different regions of Russian Federation / F. K. Alimova, N. G. Zakharova, G. A. Mako, A. N. Fattakhova [et al.] // Pakistan J. of scientific and industrial reseach. – 2002. – P. 38-45. – direct text.

153 Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists / D. G. Georgakopoulos, P. Fiddaman, C. Leifert, N. E. Malathrakis // J. Appl Microbiol. – 2002. – V. 92, № 6. – P. 1078–1086. – direct text.

154 Использование грибов рода *Trichoderma* для утилизации растительного сырья / М. А. Пикозина [и др.] .– Текст : непосредственный // Лесной и химический комплексы – проблемы и решения: сб. ст. по материалам всерос. науч.-практ. конф., посвященной 80-летию СибГТУ. – Красноярск : СибГТУ, 2010. – Т. 2. – С. 6-9.

155 Геллер, И. Т. Рост и развитие гриба *Trichoderma harzianum* на гранулированных питательных средах / И. Т. Геллер, И. Б. Беркутова, А. Л. Переверзева. – Текст : непосредственный // Биотехнология микроорганизмов в сельском хозяйстве. – Москва, 1989. – С. 115-122.

156 Рязанова, Т. В. Биоконверсии вегетативной части топинамбура микро- и макроскопических грибов / Т. В. Рязанова, А. Н. Чупрова, Ю. А. Литовка. – Текст : непосредственный // Системы. Методы. Технологии. – 2016. – № 1 (29). – С. 147-151.

157 Проблемы применения растительных отходов для получения биологических препаратов защиты растений / Ю. А. Литовка, А. Г. Савицкая, Т. В. Васильевна, Н. А. Нешумаева. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2011. – № 3. – С. 167-172.

158 Бондарь, П. Н. Штаммы грибов рода *Trichoderma* Pers (Fr.) как основа для создания препаратов защиты растений и получения кормовых добавок : специальность 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Полина Николаевна Бондарь ; Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. – Москва, 2011. – 220 с. – Текст : непосредственный.

159 Махова, Е. Г. Культивирование грибов рода *Trichoderma* на углеводных субстратах и получение биопрепарата : специальность 03.00.23 «Биотехнология» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических

наук / Елена Геннадьевна Махова. – Красноярск, 2003. – 22 с. – Текст : непосредственный.

160 Заика, Н. А. Твердофазная ферментация сибирских штаммов грибов рода *Trichoderma* / Н. А. Заика, Т. И. Громовых. – Текст : непосредственный // Сибирский экологический журнал. – 2007. – № 3. – С. 471-475.

161 Ryazanova, T. V. The effect of storage of wood green of fir to the composition of the essential oil / T. V. Ryazanova, S. R. Loskutov, A. A. Aniskina // Scientific research of the SCO countries: Synergy and integration: materials of the International Conference (26 March, 2019). – Beijing, PRC. – 2019. – P. 1. – P. 163-168. – ISBN 978-5-905695-99-5. – direct text.

162 Левин, Э.Д. Переработка древесной зелени / Э. Д. Левин, С. М. Репях. – Москва : Лесная промышленность, 1984. – 120 с. – Текст : непосредственный.

163 Коноваленко, Л. Ю. Использование кормовых ресурсов леса в животноводстве: науч. аналит. обзор. / Л. Ю. Коноваленко. – Москва : ФГБНУ «Росинформагротех», 2011. – 52 с. – Текст : непосредственный.

164 Продукты переработки древесины – сельскому хозяйству / Р. М. Волюнова, Р. М. Яншевский, З. Я. Пусена, Л. П. Спрога. – Текст : непосредственный. – Рига, 1973. – Т.1. – .90-93.

165 Ягодин, В. И. Основы химии и технологии переработки древесной зелени / В. И. Ягодин. – Ленинград : ЛГУ, 1981. – 224 с. – Текст : непосредственный.

166 Дмитроченко, А. П. Кормление сельскохозяйственных / А. П. Дмитроченко, П. Д. Пшеничный. – Ленинград, 1975. – 480 с. – Текст : непосредственный.

167 Новый белок. Готов ли российский рынок к альтернативным кормовым белкам. URL: <https://www.agroinvestor.ru/animal/article/33131-novyuy-belok-gotov-li-rossiyskiy-rynok-k-alternativnym-kormovym-belkam/> (дата обращения 15.01.2021). – Текст: электронный.

168 Разумкова, Г. М. Перспективы биоконверсии отходов сельскохозяйственного производства в кормопроизводстве / Г. М. Разумкова, Д. А. Разумков. – Текст : непосредственный // Актуальные вопросы теории и практики современ-

ной биотехнологии : материалы всерос. науч.-практ. конф. – Санкт-Петербург : Ленинградский государственный университет им. А.С. Пушкина, 2015. – С. 13-18.

169 Mamaeva, O. O. Use of Post-extraction Fir Wood Greenery Residues by the Bioconversion Method with the Production of Feed Additives / O. O. Mamaeva, E. V. Isaeva. – Текст: электронный // Forests. – 2021. – № 12 (3). – P. 272-283. – URL: <https://doi.org/10.3390/f12030272>.

170 Мамаева, О. О. Компонентный состав продуктов ферментации вегетативной части древесный растений базидиальными грибами *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst (Fr5-15) / О. О. Мамаева, Е. В. Исаева. – Текст : непосредственный // Хвойные бореальной зоны. – 2020. – Т. XXXVIII, № 5-6. – С. 259-264.

170 Рядчиков, В. Г. Основы питания и кормления сельскохозяйственных животных / В. Г. Рядчиков. – Краснодар : КГАУ, 2014 – 616 с. – Текст : непосредственный.

171 Корма, их классификация и питательная ценность [Электронный ресурс]. URL: <https://helpiks.org/8-101241.html> (дата обращения: 12.08.2020).

172 Питательная ценность основных кормов для крупного рогатого скота [Электронный ресурс]. URL: <https://agro.marimmz.ru/pitatelnaya-cennost-osnovnyhkormov-dlya-krs-2019> (дата обращения: 12.08.2020).

173 Коробов, А. П. Кормление животных с основами кормопроизводства / А. П. Коробов, Л. А. Сивохина. – Саратов : Саратовский ГАУ, 2017. – 126 с. – Текст : непосредственный.

174 Рядчиков, В. Г. Основы питания и кормления сельскохозяйственных животных / В. Г. Рядчиков. – Краснодар, 2014. – 616 с. – ISBN978-5-94672-671-9. – Текст : непосредственный.

175 Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных / Под ред. А. П. Калашникова, В. И. Фисинина, В. В. Щеглова, Н. И. Клейменова [и др.]. – Москва : «КолосС», 2003. – 456 с.

176 Использование хвойной зелени, хвои и хвойной муки в рационе животных : сайт. – URL : <http://www.zivotnovodstvo.ru/ispol-zovaniexvojnoj zeleni -xvoi-i>

xvojnoj-muki-v-racionax-zhivotnyx/ (дата обращения: 12.08.2020). – Текст : электронный.

177 Переваривание корма сельскохозяйственными животными при пищеварении : сайт. – URL: <http://farmer1.ru/jivotnovodstvo/text/perevarivanie-korma> (дата обращения 15.11.2019). – Текст: электронный.

178 Mycobank Database : website. – URL: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/22148> (accessed on 15.11.2020). – Text : electronic.

179 Сравнительная характеристика морфологии глубинной культуры ксилотрофных базидиомицетов рода *Pleurotus* – продуцентов биологически активных веществ / В. В. Тарнопольская, О. В. Кислева, Е. В. Алаудинова, П. В. Миронов. – Текст : непосредственный // Хвойные бореальной зоны. – 2014. – Т. XXXII, № 3-4. – С. 103-107.

180 Гарибова, Л. В. Грибы. Энциклопедия природы России / Л. В. Гарибова, И. И. Сидорова. – Москва : Просвещение, 1997. – 352 с. – Текст : непосредственный.

181 Штерншис, М. В. Биотехнология в защите растений / М. В. Штерншис, О. Г. Томилова, И. В. Томилова. – Новосибирск : Новосибирский государственный аграрный университет, 2001. – 156 с. – Текст : непосредственный.

182 Рязанова, Т. В. Химия древесины. Монография / Т. В. Рязанова, Н. А. Чупрова, Е. В. Исаева // Saarbrücken. Germany: LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co.KG, 2012. – 428 с. – Библ.: с. 405-414. – Текст : электронный.

183 Исаева, Е. В. Химический состав листьев тополя бальзамического / Е. В. Исаева, Т. В. Рязанова – Текст : непосредственный // Интеллектуальный капитал и способы его применения: сб. трудов по итогам XXIII междунар. науч.-практ. конф. (09 июня 2016 г.). – Новосибирск : Международный Научный Институт «Educatio», 2016. – № 5 (23) – С. 76-78.

184 Кейтс, М. Техника липидологии / М. Кейтс. – Москва : Мир, 1975. – 322 с. – Текст : непосредственный.

185 Курегян, А. Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов / А. Г. Курегян. – Текст : непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2 (23). – С. 5166-5172.

186 Каротиноиды, хлорогеновые кислоты и другие природные соединения плодов рябины / И. А. Гостищев, В. И. Дайнека, И. П. Анисимович [и др.]. – Текст : непосредственный // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия : Естественные науки. – 2010. – Т. 10, № 3. – С. 83-92.

187 Плешков, Б. П. Практикум по биохимии растений / Б. П. Плешков. – Москва : Агропромиздат, 1985. – 255 с. – Текст : непосредственный.

188 Покровский, А. А. О биологической и пищевой ценности продуктов питания / А. А. Покровский. – Текст : непосредственный // Вопросы питания. – 1975. – № 3. – С. 25-40.

189 Joint FAO/WHO Ad hoc expert committee on energy and protein requirements. – Rome, 1973. – 522 p. – direct text.

190 Девяткина, В. А. Методы определения витаминов / В. А. Девяткина. – Москва : Пищепромиздат, 1954. – 135 с. – Текст : непосредственный.

191 Чупахина, Г. Н. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум / Г. Н. Чупахина. – Калининград, 2000. – 59 с. – Текст : непосредственный.

192 Дмитриева, Е. Д. Молекулярно-массовое распределение гуминовых веществ и гиматомелановых кислот торфа различного генезиса Тульской области / Е. Д. Дмитриева, М. М. Леонтьева, К. В. Сюндюкова. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2017. – № 4. – С. 187-194.

193 Спирин, А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот / А. С. Спирин. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 1958. – Т. 23. – № 4. – 656 с.

194 Метод определения перевариваемости кормов *in vitro* / А. П. Жуков [и др.]. – Текст : непосредственный // Труды Саратовского зооветинститута. – 1961. – Т. 10. – С. 109-124.

195 Pandey, A. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocess and products / A. Pandey, C. R. Soccol, D. Mitchell // Process Biochemistry. –2000. – Vol.35. – P. 1153–1169. – direct text.

196 Бухало, А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / А. С. Бухало. – Киев : Наукова думка, 1983. – 144 с. – Текст : непосредственный.

197 ГОСТ 14161-86. Семена хвойных древесных пород. Посевные качества. Технические условия (введ. в действие с 1 июля 1987 г. взамен ГОСТ 14161-69) / Госстандарт СССР. Москва : Изд-во стандартов, 1986. – 11 с. – Текст : непосредственный.

198 ГОСТ 13056.6-97. Семена деревьев и кустарников. Метод определения всхожести (введ. в действие с 1 июля 1998 г. взамен ГОСТ 13056.6-75). Москва : Изд-во стандартов, 1997. – 38 с. – Текст : непосредственный.

199 Пентелькин, С. К. Итоги изучения стимуляторов роста и полимеров в лесном хозяйстве за последние 20 лет / С. К. Пентелькин. – Текст : непосредственный // Лесохозяйственная информация. – 2003. – № 11. – С. 34-53.

200 Сизова Т. П. Род Пеницилл (*Penicillium*) / Жизнь растений // гл. ред. Ал. А. Фёдоров, ред. тома М. В. Горленко. – Текст : непосредственный. – Москва : Просвещение, 1976. – Т. 2. – С. 383-387.

201 Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – Москва : МГУ, 1994. – 512 с. – Текст : непосредственный.

202 Егоров, Н. С. Практикум по микробиологии / Н. С. Егоров. – Москва : Высшая школа, 1976. – 273 с. – Текст : непосредственный.

203 ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести (введ. в действие с 1 июля 1986 г. взамен ГОСТ 12038-66). – Москва : ИПК Изд-во стандартов, 2004. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200023365> (дата обращения 15. 09. 2021). – Текст: электронный.

204 Пен, Р. З. Планирование эксперимента в Statgraphics Centurion / Р. З. Пен. – Красноярск : СибГТУ , 2014. – 292 с. – Текст : непосредственный.

205 Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – Москва : Высш. шк., 1990. – 351 с. – Текст : непосредственный.

206 Elemental Content in *Pleurotus ostreatus* and *Cyclocybe cylindracea* Mushrooms: Correlations with Concentrations in Cultivation Substrates and Effects on the Production Process / G. Koutrotsios, G. Danezis, C. Georgiou, G.I. Zervakis. // Molecules. – 2020. – № 25 (9). – P. 2179. – URL : [https://doi.org/ 10.3390/molecules25092179](https://doi.org/10.3390/molecules25092179) (accessed on 15.11.2020). – Text : electronic.

207 Нормы и требования № 13-7-2/174. Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных. – Москва, 1997. – С. 100. – Текст : непосредственный.

208 Sashenkova, S. A. The influence of vitamins and their precursors on the growth and development of the mycelia cultures of basidiomycetes xylotrophic mushrooms / S. A. Sashenkova, G. V. Ilyina // XXI century: results of the past and problems of the present. – 2014. – № 1(17). – P. 41-46. – ISSN: 2221-951X. – direct text.

209 Тютюма, Н. В. Роль микроэлементов в стимулировании роста и развития растений и повышении их устойчивости к неблагоприятным условиям среды / Н. В. Тютюма. – Текст : непосредственный // Вестник РУДН. Сер. Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2003. – № 8. – С. 129-133.

210 Липидная питательность кормов сайт. – URL : <http://zoovet.info/vet-knigi/111-kormlenie-zhivotnykh/kormlenie-zhivotnykh-2/8834-5-3-lipidnayapitalnostkormov> (дата обращения 20.09.2020). – Текст: электронный.

211 Гордон, А. Спутник химика / А. Гордон, Р. Форд. – Москва : Мир, 1976. – 542 с. – Текст : непосредственный.

212 Беллами, Л. Инфракрасные спектры сложных молекул / Л. Беллами. – Москва : Издательство иностранной литературы, 1964. – 590 с. – Текст : непосредственный.

213 Тарасевич, Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений / Б. Н. Тарасевич. – Москва : Химический факультет МГУ, 2012. – 54 с. – Текст : непосредственный.

214 Казицына, Л. А. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии / Л. А. Казицына, Н. Б. Куплетская. – Москва : Высшая школа, 1971. – 264 с. – Текст : непосредственный.

215 Курегян, А. Г. Спектрофотометрия в анализе каротиноидов / А. Г. Курегян. – Текст : непосредственный // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-23. – С. 5166-5172.

216 Галашкина, Н. Г. Флавоноиды почек *Betula pendula* Roth / Н. Г. Галашкина, Д. Н. Ведерников, В. И. Рошин. – Текст : непосредственный // Растительные ресурсы, 2004. – Т.40, вып. 1. – С.62-68.

217 Групповой состав компонентов почек *Betula pendula* Roth / Д. Н. Ведерников, Н. Г. Галашкина, В. И. Рошин. – Текст : непосредственный // Растительные ресурсы. – 2004. – Т.40, вып. 2. – С.83-88.

218 Колесников, М. П. Формы кремния в растениях / М. П. Колесников. – Текст : непосредственный // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 301-332.

219 Phytol: A review of biomedical activities / M. T. Islam, E.S. Ali, S.J. Uddin, S. Shaw [et al.] // Food Chem Toxicol. 2018. – № 121. – P. 82-94. – Doi: 10.1016/j.fct.2018.08.032. – direct text.

220 Kuhl, H. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration / H. Kuhl. Climacteric, 2005. – P. 3-63. – Doi: 10.1080/13697130500148875. PMID: 16112947. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16112947/> (дата обращения 10.01.2022). – Текст: электронный.

221 Megestrol acetate: clinical experience / L. Schacter, M. Rozencweig, R. Canetta, S. Kelley [et al.] // Cancer Treat. Rev., 1989. – V. 16 (1). – P. 49–63. – Doi:10.1016/0305-7372(89)90004-2. – URL : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2471590/> (дата обращения 10.01.2022). – Текст: электронный.

222 Barakat, R. R. Principles and Practice of Gynecologic Oncology / R. R. Barakat, M. Markman, M. Randall. – Lippincott Williams & Wilkins, 2009. – 447 p. – ISBN 978-0-7817-7845-9. – direct text.

223 γ -Sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells / S. Sundarraj, R. Thangam, V. Sreevani, K. Kaveri [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2012. – V. 141(3). P. – 803-809. – Doi: 10.1016/j.jep.2012.03.014. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22440953/> (дата обращения 10.01.2022). – Текст: электронный.

224. Isolation and Identification of gamma-sitosterol by GC-MS from Roots of *Girardinia heterophylla* / N. Tripathi, S. Kumar, R. Singh, C. J. Singh // *Oriental Journal of Chemistry.* – 2013. – V. 29(2). – P. 705-707. – DOI:10.13005/ojc/290245. – direct text.

225 Katz, T. Insect repellents: Historical perspectives and new developments / T. Katz // *Journal of the American Academy of Dermatology.* – 2008. – Vol. 58, No. 5. – P. 865-871. – Doi:10.1016/j.jaad.2007.10.005. – direct text.

226 Войткевич, С. А. 865 душистых веществ для парфюмерии и бытовой химии / С. А. Войткевич. – Москва : Пищевая промышленность, 1994. – 305 с. – Текст : непосредственный.

227 4-Meth-oxy-3-nitro-biphen-yl / X. Chao, X. Zhang, K. Wang, J. Ji [et al.] // *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep*, 2012. – Doi: 10.1107/S1600536811052846. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2225-9401/> (дата обращения 10.01.2022). – Текст: электронный.

228 Липова, Е. А. Применение в кормлении птицы БВМК / Е. А. Липова, А. К. Карапетян, М. А. Шерстюгина // *Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: наука и высшее профессиональное образование.* – 2014. – Т.33, № 1. – С. 173-176. – Текст : непосредственный.

229 Premixes in the feeding of broiler chickens / S. I. Nikolayev, V. N. Struk, A. K. Karapetyan N. V. Struk, E [et al.] // *Vestnik OrelGAU.* – 2013. – № 5, Т.44. – P. 46-50. – direct text.

230 Влияние премиксов на молочную продуктивность коров / С. В. Чехранова, Т. А. Акмалиев, Л. Ф. Ермолова, О. Ю. Агапова. – Текст : непосредственный // *Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса.* – 2013. – Т.29, № 1. – P. 131-135.

231 Аминокислоты в кормлении КРС : сайт. – URL: <https://agropremix.ru/page10.html> (дата обращения 10.11.2020). – Текст: электронный.

232 Крупа из зерна ржи и тритикале : сайт. – URL: <https://vniiz.org/science/publication/article-221%20> (дата обращения 10.11.2020). – Текст: электронный.

233 Калашникова, А. П. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочное пособие / А. П. Калашникова, В. И. Фисинина, В. В. Щеглова, Н. И. Клейменова. 3-е изд. – Москва, 2003. – 456 с. – ISBN 5-94587-093-5. – Текст : непосредственный

234 Минеральные элементы в кормах и методы их анализа / В. М. Косолапов, В. А. Чуйков, Х. К. Худякова, В. Г. Косолапова. – Москва : ООО «Угрешская типография», 2019. – 272 с. – ISBN 978-5-91850-037-8. – Текст : непосредственный.

235 Справочные таблицы по кормлению сельскохозяйственных животных / В. Н. Чичаева, Т. Н. Комиссарова, Н. В. Воробьева, Т. П. Логинова. – «Зоотехния» ФГБОУ ВО НГСХА. – Нижний Новгород, Россия, 2017. – 67 с. – Текст : непосредственный.

236 Витаминная питательность кормов и пути решения проблемы профилактики авитаминозов в свиноводстве / С. Н. Хохрин, К. А. Рожков, А. В. Аристов, Д. А. Саврасов. – Текст : непосредственный // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2016. – № 3 (50). – С. 99-106. – Doi:10.17238/ISSN2071-2243.2016.3.99.

237 Клопов, М. И. Биологически активные вещества в физиологических и биохимических процессах в организме животного / М. И. Клопов, В. И. Максимов. – Санкт-Петербург : Изд-во «Лань», 2012. – 448 с. – Текст : непосредственный.

238 Величко, Н. А. Химический состав плодового тела гриба *Pleurotus Ostreatus* (Fr) Kumm / Н. А. Величко, З. Н. Берикашвили. – Текст : непосредственный // Вестник КРАГАУ. – 2008. – № 4. – С. 274-278.

239 Роль клетчатки в кормлении жвачных : сайт. – URL: <https://www.actives-tudy.info/rol-kletchatki-v-kormlenii-zhvachnykh-zhivotnykh/> (дата обращения 15.10.2020). – Текст: электронный.

240 The effect of the distillation method on the composition of essential oils of poplar buds / E. V. Isaeva, T. V. Ryazanova, S. R. Loskutov, A.A. Aniskina // Scientific research of the SCO countries: synergy and integration: materials of the International Conference (18 March 2020). – Beijing, China. – 2020. – P. 2 – С. 113-117. – Doi:10.34660/INF.2020.26.58280. – direct text.

241 Исаева, Е. В. Состав, свойства и переработка отходов вегетативной части тополя после извлечения экстрактивных веществ. Сообщение 3. Получение биопрепаратов на основе грибов рода *Trichoderma* / Е. В. Исаева, О. О. Мамаева, Т. В. Рязанова. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2020. – № 4. – С. 413-423. – DOI: 10.14258/jcprm.2020048469.

242 Степень, Р. А. Биологически активные вещества древесной зелени пихты и область их применения / Р. А. Степень, В. М. Воронин, С. В. Соболева. – Текст : непосредственный // Хвойные бореальной зоны. – 2017. – № 3-4. – С. 120-124.

243 Бабицкая, В. Г. Ферментативная деструкция лигнина, содержащегося в растительных субстратах мицелиальными грибами / В. Г. Бабицкая. – Текст : непосредственный // Прикладная биохимия и микробиология. – 1994. – Т. 30, № 6. – С. 827-835.

244 Применение гуминовых кислот в растениеводстве и их биологическая активность на примере гуминовых кислот торфов Среднего Приобья / М. П. Сартаков, В. А. Чумак, М. В. Ефанов, В. В. Леонов. – Текст : непосредственный // Химия и технология растительных веществ : тез. докл. VIII Всерос. науч. конф. – Калининград : Институт химии Коми НЦ УрО РАН, 2013. – С. 198.

245 Фитохимическое исследование растительных экстрактов из почек и листьев *Populus nigra* L / В. А. Ионова, Е. Е. Батырханов, Н. М. Имашева, Е. В. Щепетова. – Текст : непосредственный // Естественные науки. – 2013. – № 1 (42). – С.99–104.

246 Исаева, Е. В. К вопросу о комплексном использовании вегетативной части тополя / Е. В. Исаева, Г. А. Рейсер, Т. М. Бурдейная. – Текст : непосредственный // Известия ВУЗов. Химия и химическая технология, 2007. – Т. 50, вып. 6. – С.53–56.

247 Биологическая активность экстрактов и эфирных масел почек тополя бальзамического Красноярского края / Исаева Е.В., Г. А. Ложкина, Ю. А. Литовка, Т. В. Рязанова. – Текст : непосредственный // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С.67–72.

248 Посыпанов, Г. С. Растениеводство / Г. С. Посыпанов, В. Е. Долгодворов. – Москва : КолосС, 2006. – 612 с. – Текст : непосредственный.

249 Пономаренко, С. П. Регуляторы роста растений / С. П. Пономаренко. – Киев : Ин-т биоорг. химии и нефтехимии НАН Украины, 2003. – 319 с. – Текст : непосредственный.

250 Малашевская, О. В. Влияние системы удобрений и регуляторов роста на урожайность и качество семян при возделывании посевного гороха / О. В. Малашевская. – Текст : непосредственный // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сб. науч. тр. – Гродно : Гродненский государственный аграрный университет, 2017. – С. 131-137.

251 Чилимов, А. И. Проблемы использования стимуляторов роста в лесном хозяйстве / А. И. Чилимов. – Текст : непосредственный // Лесное хозяйство. – 1995. – № 6. – С. 11–12.

252 Пентелькин, С. К. Итоги изучения стимуляторов роста и полимеров в лесном хозяйстве за последние 20 лет / С. К. Пентелькин. – Текст : непосредственный // Лесохозяйственная информация. – 2003. – № 11. – С. 34-53.

253 Патент 2634903 Российская Федерация, МПК А01Р21/00, А01N65/00. Стимулятор проращивания семян хвойных / Тагильцев Ю.Г., Колесникова Р.Д., Шемякина А.В. № 2016120225 ; заявл. 24.05.2016 ; опубл. 08.11.2017, Бюл. № 31. 7 с. – Текст : непосредственный.

254 Острошенко, В. Ю. Влияние стимулятора роста «ЭПИН-ЭКСТРА» на энергию прорастания и лабораторную всхожесть семян сосны обыкновенной

(*Pinus silvestris* L.) / В. Ю. Острошенко. – Текст : непосредственный // Вестник КрасГАУ. – 2017. – № 11. – С. 208-218.

255 Рогозин, М. В. Селекция сосны обыкновенной для плантационного выращивания: монография / М. В. Рогозин. – Текст : электронный // Пермский гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2013. – 200 с. : сайт. – URL: [http. www.psu.ru](http://www.psu.ru) (дата обращения: 12.04.2021).

256 Койшыбаев, М. Болезни пшеницы. Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (ФАО) / М. Койшыбаев. – Анкара, 2018. – 394 с. – Текст : непосредственный.

257 Система биологической защиты овощных культур от вредителей и болезней в теплицах / В. А. Павлюшин [и др.] ; Всерос. науч.-исслед. ин-т защиты растений. – Санкт-Петербург, 2001. – 72 с. – Текст : непосредственный.

258 Berdian, G. Bilogische Bekämpfung ausgewählter Gemusekrankheiten mittels *Trichoderma harzianum* / G. Berdian // D. Pflanzenschutztag., 23-26 Sept., 1996. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirt. – Berlin-Dahlem, 1996. – P. 456-457. – direct text.

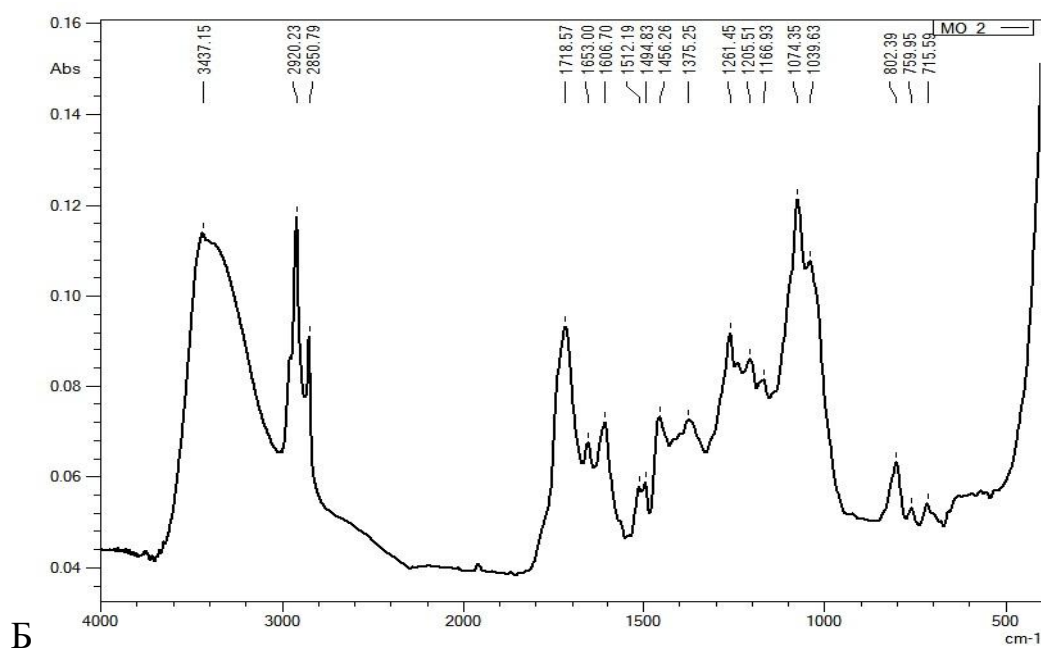
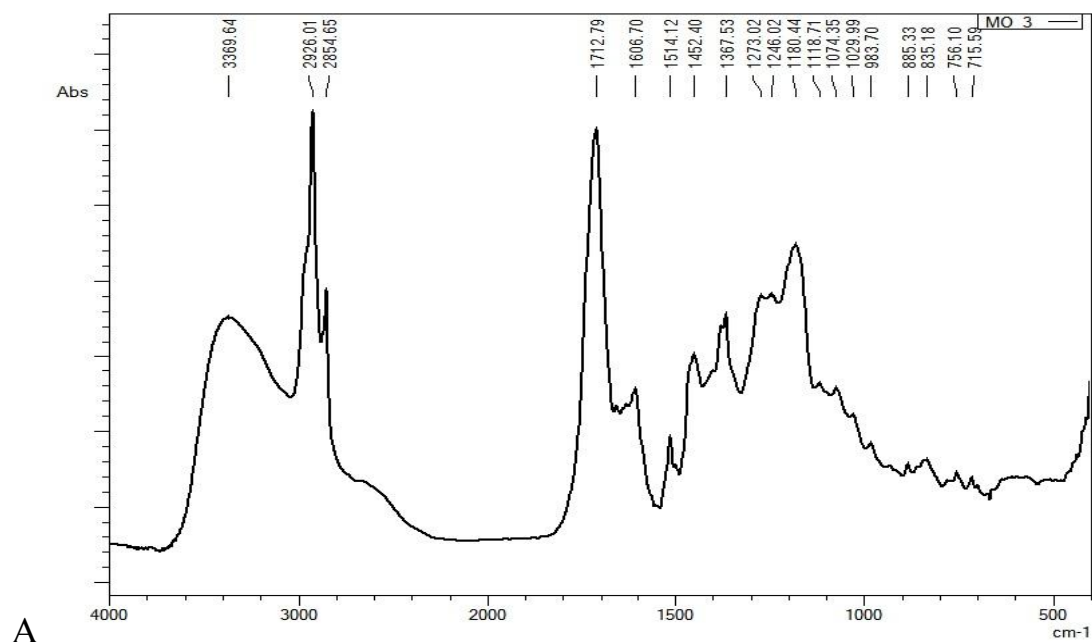
259 Okigbo, R. N. Studies of biological control of posthrwest rot in yams using *Trichoderma viride* / R. N. Okigbo // Phytopathology. – 2000. – Vol. 148, No 6. – P. 351-355. – direct text.

260 Юзефович, Е. К. Оптимизация способов внесения микробиопрепаратов для защиты зеленных культур от корневой гнили / Е. К. Юзефович, Д. В. Войтка. – Текст : непосредственный // Защита растений. – 2016. – № 40. – С. 219-229.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

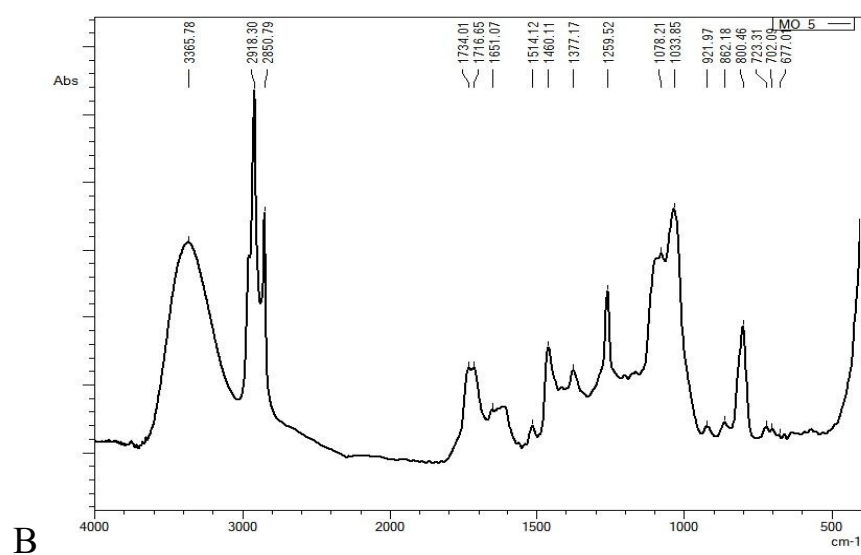
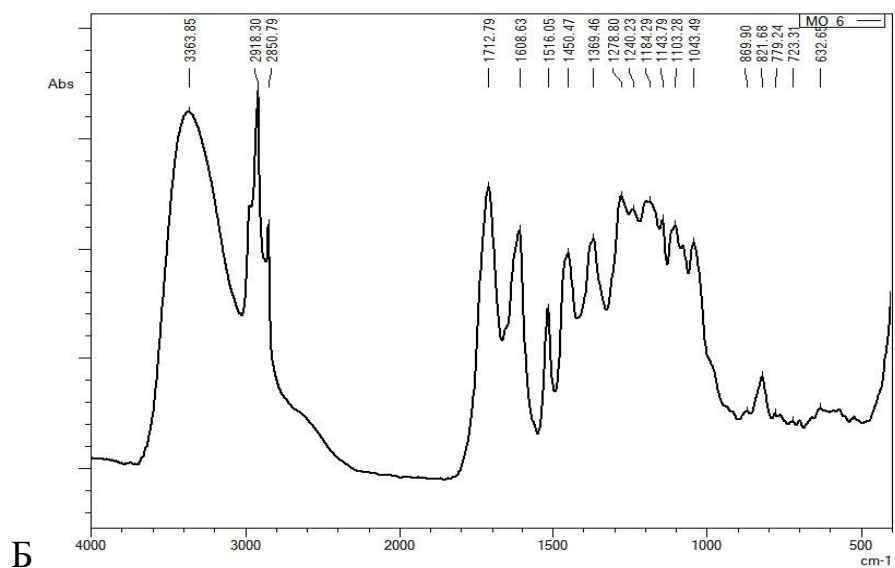
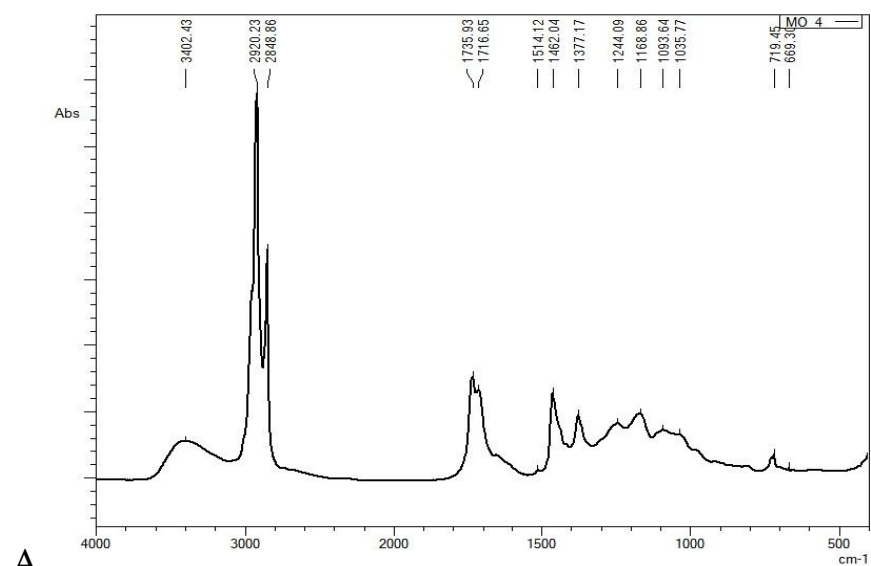
(обязательное)

Результаты исследования экстрактов листьев



А– диэтиловый, Б – этилацетатный

Рисунок А.1 – ИК спектры экстрактов зеленых листьев (июнь)



А – петролейный, Б – диэтиловый, В – этилацетатный

Рисунок А.2 – ИК спектры экстрактов опавших листьев (сентябрь)

Таблица А.1 – Компонентный состав петролейного экстракта листьев тополя (июнь)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
7.756	2,2-диметил-3-пропил-оксиран	7,816
8.066	4-метилпентилловый эфир метоксиуксусной кислоты	7,426
8.137	1-метилпентил гидропероксид	0,581
17.043	2-метил-1,3-пентандиол	0,580
31.383	1-бром-3-метилциклогексан	0,513
31.987	5-(тиофен-2-ил)-метил-2Н-тетразол	3,228
35.585	2,6,6-триметил-, (1альфа,2бета,5альфа)- бицикло[3.1.1]гептан	2,044
36.659	3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол (фитол)	0,807
38.649	Бутил-2-метилпропиловый эфир 1,2- бензолдикарбоновой кислоты	3,614
38.879	Циклогексилметилгептиловый эфир сернистой кислоты	0,840
41.862	Этилолеат	0,739
43.290	N-этил-N-(2-метилфенил)-тиофен-2-метиламин	1,548
43.364, 45.867, 46.604, 43.834, 43.927	Метилтрис(триметилсилокси)силан	3,028
43.635	1-(2,6-дигидрокси-4-метоксифенил)-3-фенил-, (Е)- 2-Пропен-1-он	1,977
43.678, 44.863	Гексаметилциклотрисилоксан	2,997
43.791, 43.894, 44.322, 44.739, 44.990, 49.782	Декаметилтетрасилоксан	6,246
44.002, 44.202, 45.149, 44.670	3,5-бис-триметилсилил-2,4,6-циклогептатриен- 1-он	4,734
44.115	13-метилгептриаконтан	2,966
44.265	2-п-нитрофенилоксадиазол-1,3,4-он-5	1,012
44.477	Диизооктиловый эфир 1,2- бензолдикарбоновой кислоты	7,574
45.431, 47.175	Эйкозан	8,574
45.552	N-(2-фторфенил)-тиофен-2-метиламин	1,176
50.100	Триметил[4-(1,1,3,3- тетраметилбутил)фенокси]силан	1,217
54.336	2,3-дигидро-6-нитро-1,4-фталазиндион	2,388
Итого идентифицировано		73,625

Таблица А.2 – Компонентный состав петролейного экстракта листьев тополя (июль)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
1	2	3
7.764	1-этилбутил гидропероксид	0,937
8.076	4-метил-2-пентанол (метилизобутилкарбинол)	1,206

1	2	3
29.071	Диэтилфталат	3,605
35.592	1,19-эйкосадиен	0,920
35.751	6,10,14-триметил-2-пентадеканон	0,518
41.875, 42.136, 42.438, 42.901, 43.143, 43.528, 44.738	Эйкозан	8,536
42.316	3,7,11,15-тетраметил-2-гексадец-1-ол (фитол)	1,060
42.643	1-нонадец-ен	0,675
42.725, 42.974, 43.017, 43.294, 43.365, 43.578, 43.733, 43.896, 44.083	Z- 14-нонакозанон	10,349
42.778	2-циклогексилундекан	0,659
43.180	1-(1,5-диметилгексил)-4-(4- метилпентил)циклогексан	0,986
43.408	Циклопентаны, 1,1'-(3-(2- циклопентилэтилиден)-1,5-пентандиил)бис-	0,804
43.459	2-циклогексилдекан	0,853
43.636	1-(2,6-дигидрокси-4-метоксифенил)-3-фенил-, (Е)- 2-пропен-1-он	3,343
43.815	3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидрокси-2,4- циклогексадиен-1-он	0,715
43.950, 44.023, 45.921	2-(ацетоксиметил)-3- (метоксикарбонил)бифенилен	2,634
44.116	Пентаказан	3,889
44.325	диэтилбис(триметилсилиловый) эфир кремниевой кислоты	1,597
44.396, 44.571, 45.313, 45.366, 50.100, 48.306	2,3-дигидро-6-нитро-1,4-фталазиндион	5,102
44.477	Диизооктиловый эфир 1,2-бензолдикарбоновой кислоты	2,877
44.658, 49.788	2,4-диметил-бензо[h]хинолин	2,65
44.923, 46.606, 44.990, 45.158, 45.242, 45.733	Гексаметилциклотрисилоксан	9,692
45.429	Октадекан	3,083
45.578	1,4-фениленбис[триметил]силан	0,725
46.011	Триметил(4-трет-бутилфенокси)силан	1,397
46.227	1-(4,4,4-трифтор-1,3-дитиобутил)-2-(3,3,3- трифтор-1,2-дитиопропил)-этан	1,957
46.923	Мегестрола ацетат	1,411
47.181	3-метил-гениекозан	3,047
49.585	1,2-бис(триметилсилил)бензол	1,167
49.708	Триметил-5-метил-2-(1- метилэтил)феноксисилан	0,533
54.354	γ-ситостерин	5,135
Итого идентифицировано		82,062

Таблица А.3 –Компонентный состав петролейного экстракта листьев тополя (сентябрь)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
7.173	2-пентанон	0,591
7.762	1-этилбутил гидропероксид	1,303
8.075	2-метил-3-пропил-, цис-оксиран	1,857
8.431	Циклогексилоктиловый эфир щавелевой кислоты	2,846
35.591	2,6,6-триметил-, (1альфа,2бета,5альфа)- (цис- пинан) бицикло[3.1.1]гептан	1,709
35.754	6,10,14-триметил-2-пентадеканон	2,481
36.660, 41.293, 42.319	3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол (фитол)	5,360
39.413	Этиловый эфир гексадекановой кислоты	3,855
41.810	Этиловый эфир линолевой кислоты	2,609
41.878	Этилолеат	19,661
42.102	Этиловый эфир октадекановой кислоты	0,843
42.901	Генэйкозан	0,941
43.233	4а(2Н)-нафталенол, октагидро-, транс-	0,545
43.296	4,8,12,16-тетраметилгептадекан-4-олид	0,743
43.528, 44.118, 44.737, 45.437	Эйкозан	11,664
46.227	Октакозан	0,889
46.604, 61.766	Гексаметилциклотрисилоксан	1,354
46.924	Браллобарбитал	0,526
47.184	Гептадекан	4,932
48.267	2,3-дигидро-2,8-диметил-бенз[b]-1,4- оксазепин-4(5Н)-тион	0,591
48.909	Z-11(13-метил)тетрадецен-1-олацетат	0,686
49.798	Z-14-нонакозан	2,241
50.108	Стигмастан-3,5-диен	2,443
52.380	Декаметилтетрасилоксан	0,586
54.370	22,23-дигидростигмастерол (ситостерол)	8,233
Итого идентифицировано		80,110

Таблица А.4 – Компонентный состав диэтилового экстракта листьев тополя (июнь)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
1	2	3
5.194	5-метил-2-фенил-1Н-индол	0,506
5.281	4-этил-гептан	0,874
5.359	4-метил-октан	1,703
6.791	1-нитро-2-ацетамидо-1,2-дидезокси-d- глюцитол	0,501
7.176	2,5-гександион	1,020
7.765	1-этилбутилгидропероксид	13,254

1	2	3
7.871	3-метил-2-бутеновая кислота, октадециловый эфир	0,693
8.081	2-метил-3-пропил-цис-оксиран	24,051
9.558	Транс-4-(2-(5-нитро-2-фурил)винил)-2-хинолинамин	0,598
9.656	(2-ацетиламиноэтил)-амид 4-аминофуразан-3-карбоновой кислоты	0,722
13.443	3-метилбутанамид	1,246
13.579, 13.635	4,5-диэтил-октан	1,947
15.886	Диэтиловый эфир бутандиовой кислоты	1,900
25.654	4-(2,6,6-триметил-2-циклогексен-1-ил)-3-пентен-2-он	0,553
30.745	Изоцитронеллол (7-октен-3-ол, 3,7-диметил-)	0,869
31.000	Изометил-бета-ионон	2,967
31.156	2Н-индено[1,2-б]фуран-2-он, 3,3а,4,5,6,7,8,8b-октагидро-8,8-диметил	1,131
31.829	Этилтетраметилциклопентадиен	0,521
45.432	3-метилгенэйкозан	3,660
47.177	4-додецилдиметиловый эфир 1,2,4-бензолтрикарбоновой кислоты	2,799
Итого идентифицировано		90,233

Таблица А.5 – Компонентный состав диэтилового экстракта листьев тополя (июль)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
7.774	3-гексанол (этилпропилкарбинол)	18,060
8.132, 13.471	2,4-диметил-2,4-пентандиол	58,632
19.245	1,1'-[(1-метилэтилиден)бис(окси)]бис- бутан	1,971
29.073	Диэтилфталат	4,628
42.905	4-додецилдиметиловый эфир 1,2,4-бензолтрикарбоновой кислоты	0,824
43.030, 43.677	1,2-бис(триметилсилил)бензол	1,338
43.185, 43.898, 44.120	Гексаметилциклотрисилоксан	5,307
43.474, 43.534, 43.727	Декаметилтетрасилоксан	4,498
43.608, 43.648, 43.973	3,5-бис-триметилсилил-2,4,6-циклогептатриен-1-он	3,493
44.483	5-метил-2-триметилсилилокси-ацетофенон	1,103
Итого идентифицировано		99,854

Таблица А.6 – Компонентный состав диэтилового экстракта листьев тополя (август)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
1	2	3
5.176	2,3-диметилгептан	0,677

1	2	3
5.284	4-этилгептан	1,820
5.362	4-метилоктан	4,909
6.076	9-[(тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси]-2-нонанон	0,508
6.359	3-этил-2-метилгексан	1,519
6.525	2-метил-моноангидрид молочной кислоты смешанный с циклический эфир 1- бутанбороновой кислотой	1,282
6.588	2-бромгексан	0,635
7.548	Гуанидин	3,320
7.799	1-(3-бутилоксиранил)этанон	2,307
8.001	4-этилоктан	1,736
8.123	1,1'-оксибисгексан	5,520
8.302	2,4-диметил-2,4-пентандиол	6,026
8.482	Циклогексилпентиловый эфир щавелевой кислоты	2,403
8.767	N,N-диметил-, N-оксид метанамин	0,515
9.473	2,3-диметил-2-гексанол	1,137
9.593	Трет-бутилгидропероксид	1,614
9.692	N-бутилацетамид	1,650
10.025	2-гидрокси-2,4-диметил-3-пентанон	1,538
10.720	4-метил-2-гептанон	0,974
11.797	3-этил-2-метил-2-гептанол	0,747
12.088	2-метил-2-додеканол	0,788
12.931, 14.131, 14.244	5,6-диметилдекан	5,259
12.981, 13.599, 13.649	4,5-диметилоктан	13,816
14.718	4-этилдекан	1,199
14.938	5-метилундекан	0,800
19.513	N-(1-метилэтил)- 1,3-пропандиамин	22,247
35.971, 36.011	1,3,4,6,7,8-гексагидро-4,6,6,7,8,8-гексаметил- циклопента[g]-2-бензопиран (галаксолид)	1,333
38.660	Дибутилфталат (дибутиловый эфир фталевой кислоты)	1,384
39.853	Этилен брассилат	1,000
Итого идентифицировано		88,663

Таблица А.7 – Компонентный состав диэтилового экстракта листьев тополя (сентябрь)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
1	2	3
5.276, 43.725, 43.911, 43.968, 44.480	Гексаметилциклотрисилоксан	6,082
5.353	4-метилоктан	2,814
7.177	2,5-гександион	2,083
7.759	1-этилбутилгидропероксид	17,215
7.867	3-гексанол (этилпропилкарбинол)	0,788
8.072	4-метил-2-пентанол	27,717

1	2	3
8.417	3-метил-1-(1Н-1,2,4-триазол-1-ил)бутан-2-он	3,573
8.566	2-пентанон	0,960
13.443	2,4-диметил-2,4-пентандиол	3,377
13.575	4-метил-5-метилнонан	1,203
13.630	4,5-диэтилоктан	1,298
14.117, 14.229	5,6-диметилдекан	1,481
15.949	Диэтилтолуамид	0,924
19.231	1,1,2-триметил-1-сила-3-тиациклопентан	1,907
29.145	Неопентилнониловый эфир щавелевой кислоты	1,424
33.436	(4-метилфенил)фенилметанон	1,794
38.653	Бутил-2-метилпропиловый эфир 1,2-бензолдикарбоновой кислоты	1,259
41.864	9-октадеценовая кислота	1,661
42.208	2-этилакридин	0,671
42.727, 43.473, 43.605	Декаметилтетрасилоксан	3,218
43.319	1,2-бис(триметилсилил)бензол	1,035
43.533, 44.027, 44.119	3,5-бис-триметилсилил-2,4,6-циклогептатриен-1-он	3,247
43.681	N-[4-(триметилсилил)фенил]-ацетамид	0,834
43.821	Метилтрис(триметилсилокси)силан	0,994
43.872	2-(ацетоксиметил)-3-(метоксикарбонил)бифенилен	0,703
44.155, 46.581	4-додецилдиметиловый эфир 1,2,4-бензолтрикарбоновой кислоты	2,658
45.432	1,1,1,3,5,5,5-гептаметилтрисилоксан	2,462
47.178	2,4-диметилбензо[н]хинолин	1,692
Итого идентифицировано		95,074

Таблица А.8 – Компонентный состав этилацетатного экстракта листьев тополя (июнь)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
1	2	3
5.272	Кротоновая кислота	9,164
5.335	2-бутеновая кислота (Е)-	11,848
5.704, 5.771	1-бутанол, 3-метил-ацетат	2,944
6.124	п-ксилол	1,418
6.330	N,N-диметилэтантаноамид	0,620
6.635	Этанол, 2-(пентилокси)-, ацетат	0,514
7.175	2,2-диметоксиэтанол	0,860
7.759	1-этилбутилгидропероксид	1,788
7.979	Эфир, 3-бутенилпентил	0,523
8.069	Оксиран, 2-метил-3-пропил-, цис-	2,290
8.913	1,2-этандиол моноацетат	0,837
9.280, 17.208	Этиловый эфир 2-бутеновой кислоты	4,563
11.728	3-Метилбензальдегид	1,216

1	2	3
12.539	1,1,3,3-Тетраметоксипропан	0,989
16.619	Втор-бутиламин	1,999
25.653	4-(2,6,6-триметил-2-циклогексен-1-ил)-3-пентен-2-он	0,732
29.143	2,2-дихлор-1-метилциклогексано́л	0,951
30.748	3-Оксо-2-(2-пентенил)-, метиловый эфир циклопентануксусной кислоты	2,117
31.001	9-додецилтетрадекагидроантрацен	4,204
31.156	9-бутилантрацен	2,056
31.826	4-(1-метилэтил)-бензолметанол	0,954
33.428	(4-метилфенил)фенилметанон,	2,421
34.964	2-нитродибензотиофен	0,813
35.062	4-метокси-3-нитробифенил	0,602
35.970, 37.401	7-ацетил-6-этил-1,1,4,4-тетраметилтетралин	6,413
36.005, 37.100	1,3,4,6,7,8-гексагидро-4,6,6,7,8,8-гексаметил-циклопента[g]-2-бензопиран	6,001
39.845	Этилен брассилат	8,712
43.604	3,5-бис-триметилсилил-2,4,6-циклогептатриен-1-он	0,680
43.680	Гексаметилциклотрисилоксан	0,754
43.903, 44.117, 47.178	Декаметилтетрасилоксан	2,783
43.966, 46.583	2,4-диметилбензо[h]хинолин	1,744
44.023	Метилтрис(триметилсилокси)силан	0,617
45.434	1,4-фениленбис[триметил]силан	1,563
46.152	3,5-бис-триметилсилил-2,4,6-циклогептатриен-1-он	1,593
Итого идентифицировано		78,119

Таблица А.9 – Компонентный состав этилацетатного экстракта листьев тополя (июль)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
1	2	3
6.502	8а-этокси-3а,3b,7а,8а-тетрагидро-2,2,5,5-тетраметил -, (8аР)- 7Н-1,3-диоксоло[4,5]фуоро[3,2-d][1,3]диоксин	0,555
7.760	3-гексано́л (этилпропилкарбино́л)	1,562
8.078	1,5-диметокси-2,4-диметил-3-гексано́л	2,571
8.259	4-этил-3-гексано́л	0,517
9.554	Моногидрат адипиновой дигидроксамовой кислоты	1,182
9.655	N-ацетилглицин	1,077
42.419	2-этилакридин	0,564
42.728	Триметил-5-метил-2-(1-метилэтил)феноксисилан	0,669
43.315	3,5-бис-триметилсилил-2,4,6-циклогептатриен-1-он	1,725

	2	3
43.364	3,5-бис(1,1-диметилэтил)-1,2-бензендиол	0,973
43.471, 43.603, 44.155, 44.374, 44.481, 44.632, 45.412, 46.193, 48.056	Декаметилтетрасилоксан	11,952
43.539	1,4-фениленбис[триметил]силан	1,782
43.680, 43.726, 43.815, 44.069, 44.413, 44.523, 44.735, 46.580	3,5-бис-триметилсилил-2,4,6-циклогептатриен-1-он	17,784
44.125, 44.919, 46.149	4-додецилдиметилловый эфир 1,2,4-бензолтрикарбоновой кислоты	5,189
43.779, 44.020, 43.836, 43.965, 44.186, 44.541, 44.852, 45.460, 47.168, 47.540, 46.400	Гексаметилциклотрисилоксан	25,016
44.224	Метилтрис(триметилсилокси)силан	1,013
44.242	1,2-бис(триметилсилил)бензол	1,078
44.320	Диэтил-1-(карб-н-бутокси)пропилфосфонат	1,929
44.949	2,4-диметил-бензо[h]хинолин	3,260
45.285, 46.961	1,1,1,3,5,5,5-гептаметилтрисилоксан	5,639
46.239	4-метил-2-триметилсилилоксиацетофенон	1,650
Итого идентифицировано		87,687

Таблица А.10 – Компонентный состав этилацетатного экстракта листьев тополя (август)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
1	2	3
5.352	2-пентанизотиоцианат	4,088
5.470	Триэтиламин	4,201
5.719, 5.794	2-бутеновая кислота (Е)-	9,277
5.917, 6.083, 6.138, 6.391, 6.558	Кроотоновая кислота	33,202
7.208	1-тиофен-2-илметилпиперазин	3,057
7.568	Метокси-, диметилловый эфир бутандиовой кислоты	0,830
7.801	1-этилбутилгидропероксид	0,962
8.002	4-метилдекан	0,713
8.115	4-метил-2-пентанол	1,781
8.328	2,4-диметил-2,4-пентандиол	0,774
8.936	3-оксо-, этиловый эфир бутановой кислоты	1,072
9.303	2-пропениловый эфир 2-бутеновой кислоты	0,646
10.676	1-метил-7-оксабицикло[4.1.0]гептан	3,642
11.748	2-метилбензальдегид	1,740
12.848	1,1,2,2-тетраэтоксиэтан	1,820
13.631	N-(2,5-дигидро-5-оксо-2-фуранил)- ацетамид	1,658
14.461	2-метил-бензолметанол	0,789

1	2	3
15.895	Диэтиловый эфир бутандиовой кислоты	0,581
17.230	Этиловый эфир 2-бутеновой кислоты	4,629
30.748	3-оксо-2--пентенилциклопентануксусной кислоты метиловый эфир (гедион, метилдигидро-рожасмонат)	0,976
31.006	β-изо-метилюнон	1,505
31.162	N-бензил-2-[[5-метил-2-(2-метилфенил)-1,3-оксазол-4-ил]метилсульфинил]ацетамид	0,719
35.973, 36.010	1,3,4,6,7,8-гексагидро-4,6,6,7,8,8-гексаметилциклопента[g]-2-бензопиран	3,321
39.852	Этилен брассилат	2,775
46.159	1-(4,4,4-трифтор-1,3-дитиобутил)-2-(3,3,3-трифтор-1,2-дитиопропил)-этан	0,688
Итого идентифицировано		85,446

Таблица А.11 – Компонентный состав этилацетатного экстракта листьев тополя (сентябрь)

Время удерживания, мин	Компонент	Содержание, % от суммы веществ
1	2	3
5.307, 43.477, 43.767, 43.907, 43.979, 43.603, 44.079, 44.402, 47.183, 44.024, 44.322	Гексаметилциклотрисилоксан	22,304
5.508	п-ксилол	4,454
6.128	о-ксилол	18,310
7.762	4,5-дигидро-5-фенил-, 1,1-диметилэтиловый эфир 3-изоксазолкарбопероксоевой кислоты	0,620
9.228	1,2,3-триметил-бензол	0,564
29.145	2,2,4-триметил-3-карбоксиизопропил, изобутиловый эфир пентановой кислоты	0,576
33.443	(4-метилфенил)фенилметанон	1,198
36.358	Гексилдодециловый эфир фталевой кислоты	0,572
38.655	Бутилциклогексильный эфир 1,2-бензолдикарбоновой кислоты	1,130
42.903	1,1,1,3,5,5,5-гептаметилтрисилоксан	0,504
43.081	1-метил-4-[4-гидрокси-3-метоксифенил]-гексагидропиридин	0,873
43.201, 43.257, 43.311	Метилтрис(триметилсилокси)силан	3,133
43.681, 44.204, 44.521, 48.070	3,5-бис-триметилсилил-2,4,6-циклогептатриен-1-он	8,727
43.726, 43.880, 44.242, 46.252, 44.949	Декаметилнетрасилоксан	9,207
43.860, 46.153	1,2-бис(триметилсилил)бензол	4,304
44.121	Триметил[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]силан	4,728

44.481	Диэтилбис(триметилсилил) сложный эфир кремниевой кислоты	3,168
44.741	4,6-ди-трет-бутилрезорцин	4,438
45.440	1,4-фениленбис[триметил]силан,	1,793
45.461	Триметил[4-(2-метил-4-оксо-2- пентил)фенокси]силан	3,446
46.609	Триметил[4-(1-метил-1- метоксиэтил)фенокси]силан	1,284
Итого идентифицировано		97,290

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

Химический состав растительных субстратов и результаты культивирования базидиальных грибов

Б.1 Химический состав субстратов, ростовые параметры и морфология базидиальных грибов

Таблица Б.1 – Компонентный состав субстратов

Компонент	Содержание, % а.с.с.				
	однолет- ние побе- ги	древеси- на ветки	п.э.о. почек	кора вет- ки	п.э.о. поч- ек и опад
Вещества, экстрагируемые:					
- горячей водой	15,5	10,2	17,6	18,6	11,4
- спиртом	7,9	6,9	6,2	5,5	2,7
Полисахариды:					
- легкогидролизуемые	15,5	17,3	15,8	8,8	18,7
Трудногидролизуемые	21,3	32,0	19,4	26,2	21,7
Лигниновые вещества	29,1	29,2	33,3	24,7	32,9
Минеральные вещества	4,1	7,9	4,5	6,7	9,9
*п.э.о. – остаток после удаления эфирного масла и спирторастворимых веществ; относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %					

Таблица Б.2 – Скорость роста грибов на растительных субстратах

В миллиметрах в сутки

Субстрат	Штамм	Продолжительность культивирования, сут						
		4	6	8	10	12	15	X _{ср.}
Однолетние побеги	Fp5-15	1,6	2,3	2,5	2,6	2,7	2,6	2,4±0,41
	PP-3.2	2,2	2,3	2,3	2,5	2,6	2,6	2,4±0,17
Древесина ветки	Fp5-15	4,3	4,2	4,3	3,5	-*	-	4,1±0,39
	PP-3.2	4,0	4,7	4,3	3,5	-	-	4,1±0,51
Почки п.э.о	Fp5-15	4,3	4,0	4,2	3,6	3,5	-	3,9±0,36
	PP-3.2	2,5	2,7	2,9	3,6	3,5	-	3,0±0,49
Кора ветки	Fp5-15	1,9	2,5	2,7	2,6	3,0	-	2,5±0,40
	PP-3.2	1,8	2,1	2,7	2,9	3,0	-	2,5±0,52
* – остановка роста за счет полного обрастания субстрата								

Таблица Б.3 – Ростовый коэффициент грибов

Номер субстрата	Штамм	Продолжительность культивирования, сут						
		4	6	8	10	12	15	X _{ср.}
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Однолетние побеги	Fp5-15	3,2	4,5	5,1	5,2	5,4	5,2	4,7±0,83

Окончание таблицы Б.3

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Однолетние побеги	PP-3.2	9,0	9,3	9,2	10,0	10,4	10,4	9,7±0,63
Древесина ветки	Fp5-15	8,5	8,4	8,6	7,0	- *	-	8,1±0,75
	PP-3.2	8,0	9,4	8,6	7,0	-	-	8,3±1,01
Почки п.э.о.	Fp5-15	17,0	16,2	16,8	14,4	14,2	-	15,7±1,33
	PP-3.2	29,4	32,0	35,3	43,2	63,8	-	40,7±13,89
Кора ветки	Fp5-15	3,8	5,0	5,4	5,2	6,0		5,0±0,81
	PP-3.2	3,6	4,8	5,4	5,8	6,0		5,1±0,93
* – отсутствие данных								

Таблица Б. 4 – Скорость роста грибов на растительных субстратах

В миллиметрах в сутки

Соотношение п.э.о. почек и опада	Штамм	Продолжительность культивирования, сут						
		2	5	6	8	10	12	X _{ср.}
1:1	Fp5-15	-	1,9	2,1	3,7	4,2	- *	2,9±1,14
	PP-3.2	2,4	2,6	2,5	3,6	4,2	-	3,0±0,79
1:2	Fp5-15	-	1,7	2,2	3,3	2,9	2,6	2,3±0,62
	PP-3.2	2,5	2,2	2,7	3,2	4,2	-	3,0±0,78
1:5	Fp5-15	-	0,9	1,9	2,9	3,7	3,5	2,6±1,17
	PP-3.2	2,4	2,0	2,3	2,6	3,5	3,5	2,7±0,64
5:1	Fp5-15	-	2,0	2,4	3,6	4,2	-	3,0±1,02
	PP-3.2	2,5	2,9	3,3	4,3	4,3	-	3,4±0,82
2:1	Fp5-15	-	2,4	2,7	3,9	4,2	-	3,3±0,88
	PP-3.2	2,5	3,0	3,0	4,0	4,3	-	3,3±0,76
Примечание – на 2-е сутки у штамма Fp5-15 <i>F. pinicola</i> отсутствовал рост; * – остановка роста за счет полного обрастания субстрата								

Таблица Б.5 – Ростовой коэффициент грибов

Соотношение п.э.о. почек и опада	Штамм	Продолжительность культивирования, сут						
		2	5	6	8	10	12	X _{ср.}
1:1	Fp5-15	-	7,4	8,3	65,8	50,4	-	33,0±29,69
	PP-3.2	42,8	46,8	45,0	42,8	50,4	-	45,5±3,18
1:2	Fp5-15	-	13,6	17,3	26,3	5,8	5,2	13,6±8,75
	PP-3.2	45,0	26,4	32,0	25,5	33,6	-	32,5±4,03
1:5	Fp5-15	-	3,6	7,8	11,5	14,6	14,0	10,3±4,06
	PP-3.2	28,5	23,4	28,0	21,0	28,0	28,3	26,2±3,19
5:1	Fp5-15	-	8,0	9,5	14,3	16,6	-	12,1±4,03
	PP-3.2	45,0	51,3	59,3	102,8	102,0	-	72,1±28,14
2:1	Fp5-15	-	9,6	10,7	15,5	24,9	-	15,2±6,97
	PP-3.2	30,0	35,4	36,0	71,4	76,5	-	49,9±22,19
Примечание – на 2-е сутки у штамма Fp5-15 <i>F. pinicola</i> отсутствовал рост; * – остановка роста за счет полного обрастания субстрата								

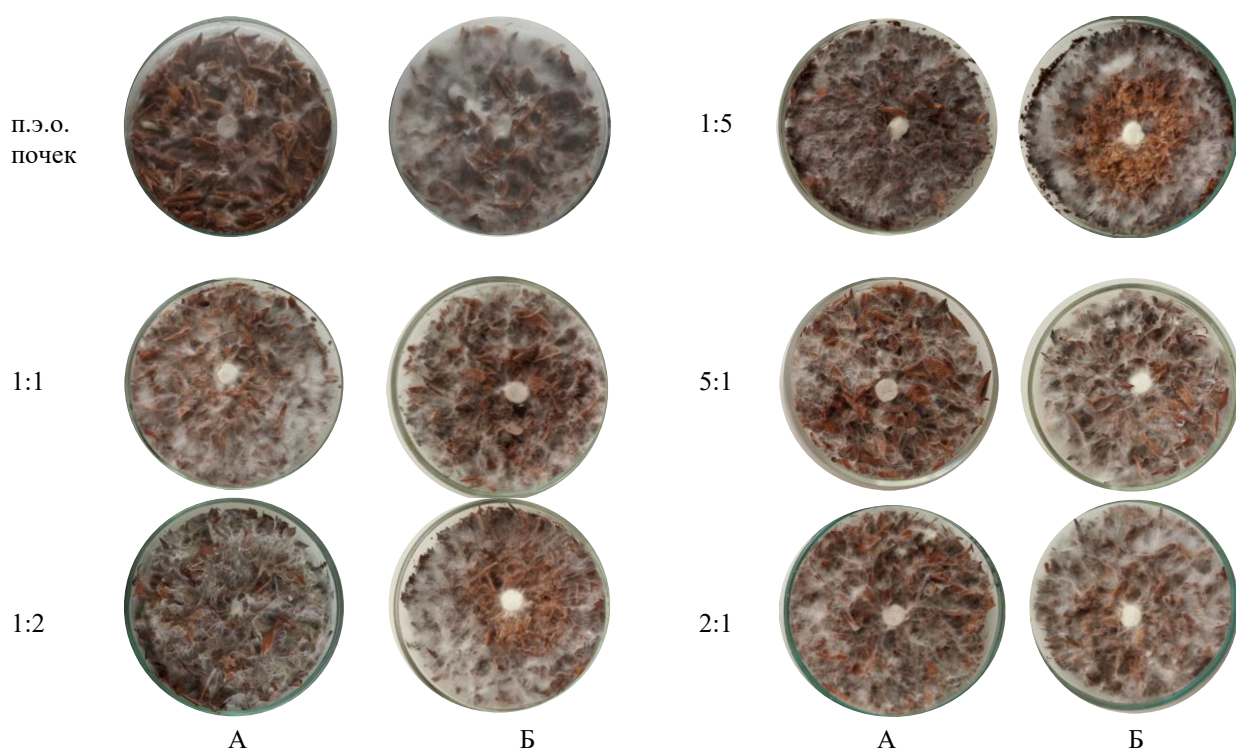


Рисунок Б.1 – Морфология колоний грибов Fr5-15 *Fomitopsis pinicola* (А) и PP-3.2 *P. pulmonarius* (Б) на субстратах из листьев тополя на 10-е сутки культивирования

Б.2 Компонентный состав смешанных субстратов и ростовые параметры базидиальных грибов, полученных в результате их биодеструкции

Таблица Б.6 – Компонентный состав субстратов

Компонент	Содержание, % а.с.с.		
	п.э.о. древесной зелени пихты	п.э.о. древесной зелени и п.э.о. почек тополя	п.э.о. древесной зелени, почек тополя и опад
Вещества, экстрагируемые:			
- горячей водой	12,5	14,9	13,5
- этиловым спиртом	3,6	2,2	2,5
Полисахариды:			
- легкогидролизуемые	17,8	14,2	12,1
- трудногидролизуемые	23,8	19,5	17,9
Лигниновые вещества	31,8	34,5	43,4
Минеральные вещества	5,9	9,0	9,2
Примечание – относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %			

Таблица Б.7 – Скорость роста грибов на растительных субстратах

В миллиметрах в сутки

Субстрат	Штамм	Продолжительность культивирования, сут							
		4	6	8	11	13	15	20	X _{ср.}
п.э.о. древесной зелени пихты	Fp5-15	0,6	1,3	2,7	2,3	2,3	2,3	2,0	1,9±0,73
	PP-3.2	1,8	2,3	2,5	2,2	2,3	2,4	2,0	2,2±0,24
п.э.о. древесной зелени пихты и почек тополя	Fp5-15	0,6	0,7	2,2	2,0	2,3	2,6	-	1,7±0,86
	PP-3.2	2,3	3,3	3,4	2,7	3,0	2,6	-	2,9±0,43
п.э.о. древесной зелени пихты и почек тополя и опад	Fp5-15	1,3	1,3	1,6	1,8	1,7	1,8	2,0	1,6±0,26
	PP-3.2	4,4	3,8	3,4	2,9	2,7	2,6	-	3,3±0,70
Примечание – прочерк означает остановку роста за счет полного обрастания субстрата									

Таблица Б.8 – Ростовой коэффициент грибов

Номер субстрата	Штамм	Продолжительность культивирования, сут							
		4	6	8	11	13	15	20	X _{ср.}
п.э.о. древесной зелени	Fp5-15	2,4	5,2	10,4	9,2	8,1	9,2	8,0	7,5±2,77
	PP-3.2	7,0	9,2	10,0	8,8	9,2	9,6	8,0	8,8±1,02
п.э.о. древесной зелени и п.э.о. по- чек тополя	Fp5-15	2,4	2,8	8,8	8,0	9,2	10,4	15,6	8,2±4,54
	PP-3.2	9,2	13,2	13,6	9,6	12,0	10,6	16,0	12,0±2,43
п.э.о. древесной зелени пихты, по- чек тополя и опад	Fp5-15	3,9	6,5	7,9	9,4	10,7	10,8	11,4	8,7±2,73
	PP-3.2	8,8	15,2	13,6	11,6	10,8	10,4	15,6	12,3±2,57

Б.3 Химический состав продуктов биодеструкции

Таблица Б.9 – Компонентный состав субстратов до и после биодеструкции

Компонент	Штамм	Содержание в субстрате, % а.с.с.			
		п.э.о. почек		опад и п.э.о. почек (1:1 по массе)	
		д/б	п/б	д/б	п/б
1	2	3	4	5	6
Вещества, экстрагируемые горячей водой	Fp5-15	17,6	13,4	11,4	7,9
	PP-3.2		14,9		13,1
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	Fp5-15	6,2	6,9	2,7	3,8
	PP-3.2		3,3		2,6
Легкогидролизуемые полисахариды	Fp5-15	15,8	7,6	18,7	13,8
	PP-3.2		10,2		8,8

1	2	3	4	5	6
Трудногидролизуемые полисахариды	Fp5-15	19,4	9,5	21,7	15,6
	PP-3.2		9,2		17,2
Лигниновые вещества	Fp5-15	33,3	30,1	32,9	24,7
	PP-3.2		34,6		27,6
Минеральные вещества	Fp5-15	4,5	7,7	9,9	8,9
	PP-3.2		4,9		8,1
* д/б – субстрат до биодеструкции; ** п/б – субстрата после биодеструкции; относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %					

Таблица Б.10 – Компонентный состав смешанных субстратов после биодеструкции

Компонент	Штамм	Содержание в субстрате, % а.с.с.		
		п.э.о. древес- ной зелени пихты	п.э.о. древес- ной зелени и почек тополя	п.э.о. древес- ной зелени и почек тополя, опад
Вещества, экстрагируемые го- рячей водой	Fp5-15	9,7/ 9,0	14,2/13,1	11,8/9,9
	PP-3.2	20,1/18,6	15,7/13,9	12,8/10,8
Вещества, экстрагируемые эти- ловым спиртом	Fp5-15	5,1/4,7	5,0/4,6	3,5/2,9
	PP-3.2	3,6/3,3	2,4/2,1	2,7/2,3
Легкогидролизуемые полисаха- риды	Fp5-15	17,3/15,6	13,7/12,6	13,6/11,4
	PP-3.2	10,4/9,6	13,2/11,7	13,9/11,8
Трудногидролизуемые полисахариды	Fp5-15	23,1/21,5	18,4/16,9	20,5/17,1
	PP-3.2	17,4/16,1	15,9/14,1	18,9/15,9
Лигниновые вещества	Fp5-15	32,9/30,6	32,5/29,7	38,2/31,9
	PP-3.2	40,1/37,2	39,3/34,7	36,9/31,2
Минеральные вещества	Fp5-15	8,9/8,3	14,1/13,0	11,2/9,4
	PP-3.2	8,3/7,7	9,8/8,7	9,5/7,8
Примечание – в числителе данные без учета убыли массы, в знаменателе указаны данные с учетом убыли массы; относительная стандартная ошибка опыта не превышает 5 %				

Таблица Б.11 – Содержание белка в субстратах до и после культивирования грибов

Субстрат (соотношение по массе 1:1)	Содержание, % а.с.с.		
	исходный субстрат	субстрат после культивирования	
		Fp5-15 <i>F. pinicola</i>	PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>
п.э.о. почек	6,6±0,51	23,9±0,45	21,4±0,51
опад и п.э.о. почек	7,3±0,49	13,3±0,47	20,4±0,60
п.э.о. древесной зелени и п.э.о. почек тополя	8,1±0,52	19,2±0,49	22,7±0,52
п.э.о. древесной зелени, п.э.о. почек тополя, опад	8,9±0,61	12,0±0,51	20,1±0,62

Таблица Б.12 – Состав и скор незаменимых аминокислот белка биодеструктированных субстратов Fp5-15 *F. pinicola*

Аминокислота	Содержание, % от суммы аминокислот			
	опад и п.э.о. почек		п.э.о. древесной зелени пихты и почек тополя, опад	
	от суммы аминокислот	скор	от суммы аминокислот	скор
Валин	2,9	58,0	3,5	70,0
Изолейцин	2,2	55,0	1,5	37,5
Лейцин	8,6	122,9	5,6	80,0
Фенилаланин + Тирозин	6,4	106,7	6,2	103,3
Метионин + Цистин	2,2	62,8	0,9	25,7
Треонин	2,9	72,5	4,1	102,5
Лизин	4,3	78,2	2,9	52,7
Аргинин	2,2	-	2,4	-
Гистидин	8,6	-	9,4	-

Таблица Б.13 – Содержание заменимых аминокислот белков в субстратах после биоконверсии Fp5-15 *F. pinicola*

Аминокислота	Содержание, % от суммы аминокислот	
	опад и п.э.о. почек	п.э.о. древесной зелени пихты и почек тополя, опад
Аспарагиновая кислота	21,6	11,8
Серин	5,8	8,8
Глутаминовая кислота	11,9	9,1
Тирозин	3,2	2,7
Пролин	0,7	0,6
Глицин	10,1	20,1
Аланин	9,7	13,0

Таблица Б.14 – Состав и скор незаменимых аминокислот белка биодеструктированных субстратов PP-3.2 *P. pulmonarius*

Аминокислота	Содержание, % от суммы аминокислот			
	опад и п.э.о. почек		п.э.о. древесной зелени пихты и почек тополя, опад	
	от суммы аминокислот	скор	от суммы аминокислот	скор
1	2	3	4	5
Валин	3,5	70,0	2,9	58,0
Изолейцин	2,6	65,0	1,5	37,5
Лейцин	7,7	110	8,1	115,7

1	2	3	4	5
Фенилаланин + Тирозин	6,0	100	4,1	68,3
Метионин + Цистин	1,7	48,6	2,2	62,8
Треонин	2,3	57,5	4,4	110,0
Лизин	2,6	47,3	2,9	52,7
Аргинин	1,7	-	1,5	-
Гистидин	10,3	-	9,8	-

Таблица Б.15 – Содержание заменимых аминокислот белков в субстратах после биоконверсии PP-3.2 *P. pulmonarius*

Аминокислота	Содержание, % от суммы аминокислот	
	опад и п.э.о. почек	п.э.о. древесной зелени, опад и п.э.о. почек тополя
Аспарагиновая кислота	18,2	14,7
Серин	6,8	8,8
Глутаминовая кислота	16,0	14,0
Тирозин	2,6	1,9
Пролин	0,6	0,2
Глицин	11,1	14,7
Аланин	9,1	10,3

Таблица Б.16 – Элементный состав золы субстратов после биоконверсии

Наименование	Содержание элементов в субстратах, мг/кг			
	опад и п.э.о. почек		п.э.о. древесной зелени пихты и почек тополя	
	Fp5-15 <i>F. pinicola</i>	PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>	Fp5-15 <i>F. pinicola</i>	PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>
Натрий	4,2	1,0	2,1	0,7
Магний	57,6	7,0	5,0	5,8
Фосфор	23,5	1,8	1,4	4,1
Сера	2971,3	659,4	736,1	747,8
Хлор	<4,6	31,6	346,9	136,2
Калий	150,9	7,8	12,9	12,9
Кальций	<4,5	<2,0	<10,3	<2,1
Железо	5,2	0,1	0,1	1,3
Алюминий	1,3	0,2	0,4	0,3
Хром	0,1	0,04	0,05	0,04
Марганец	0,6	0,2	0,9	1,1
Кобальт	0,008	0,006	0,003	0,003
Медь	0,3	0,08	0,08	0,6
Цинк	3,9	1,8	1,2	1,7
Селен	<0,1	<0,04	<0,2	<0,04
Бром	<0,1	0,04	<0,2	0,04
Йод	0,03	0,08	0,3	0,1

Б.4 Результаты термогравиметрии опада до и после биодеструкции

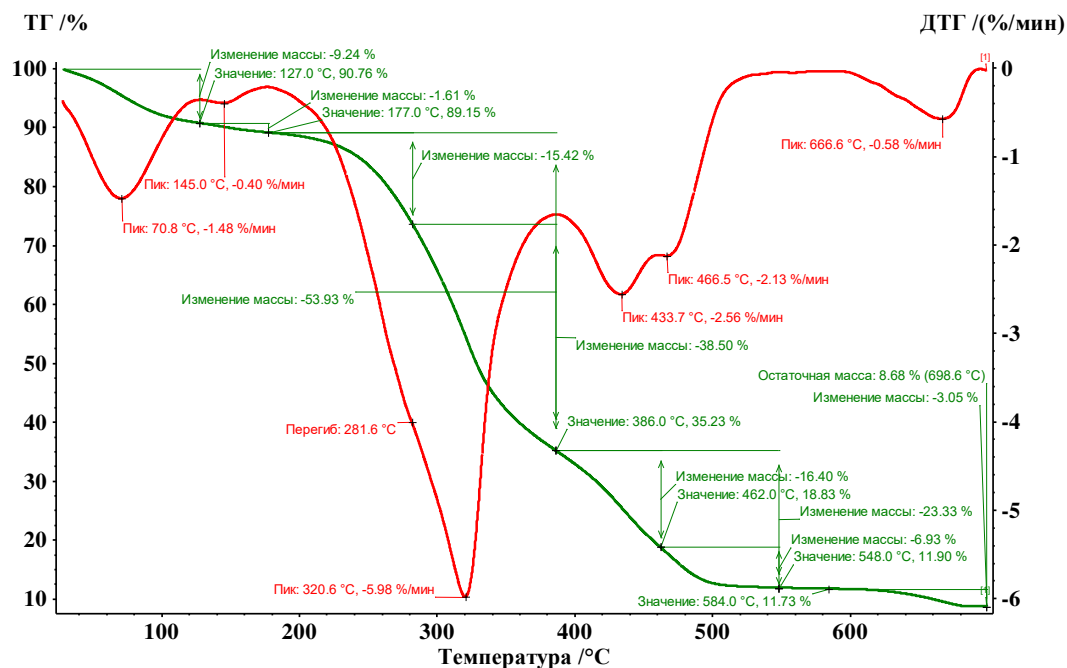


Рисунок Б.2– ДТГ-кривые термического разложения исходного опада

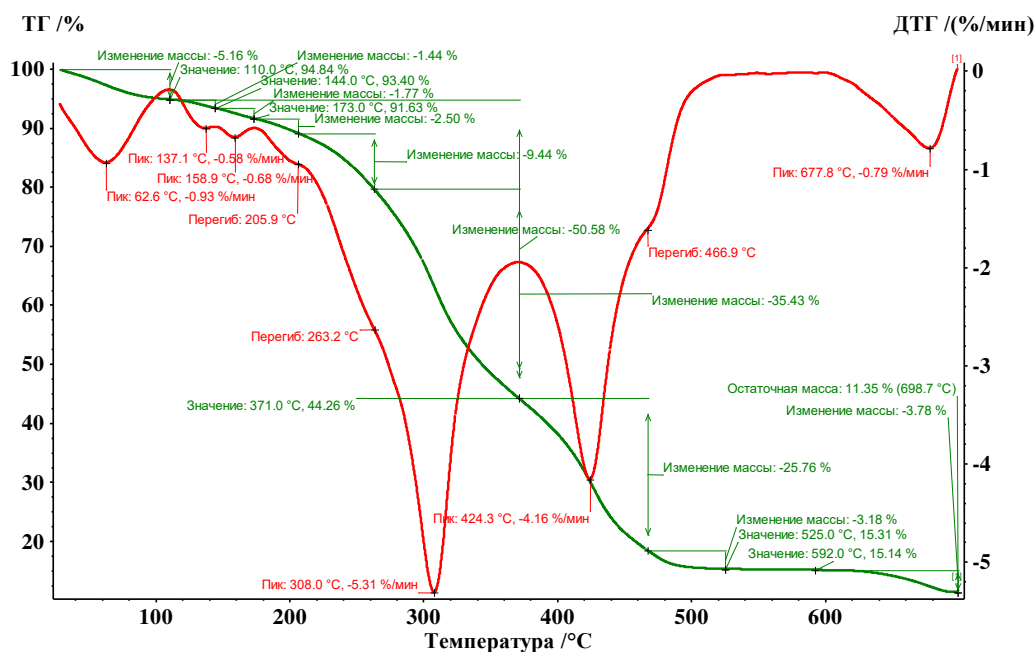


Рисунок Б.3 – ДТГ-кривые термического разложения опада после биоконверсии грибом *F. pinicola*

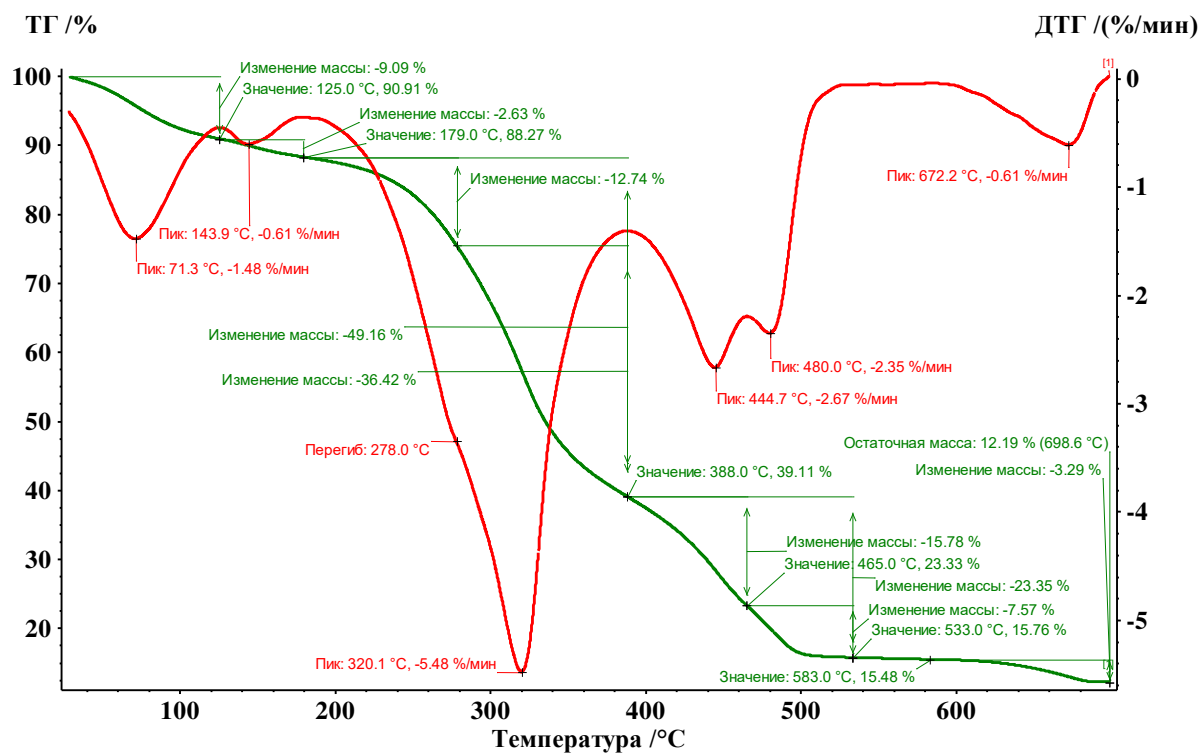
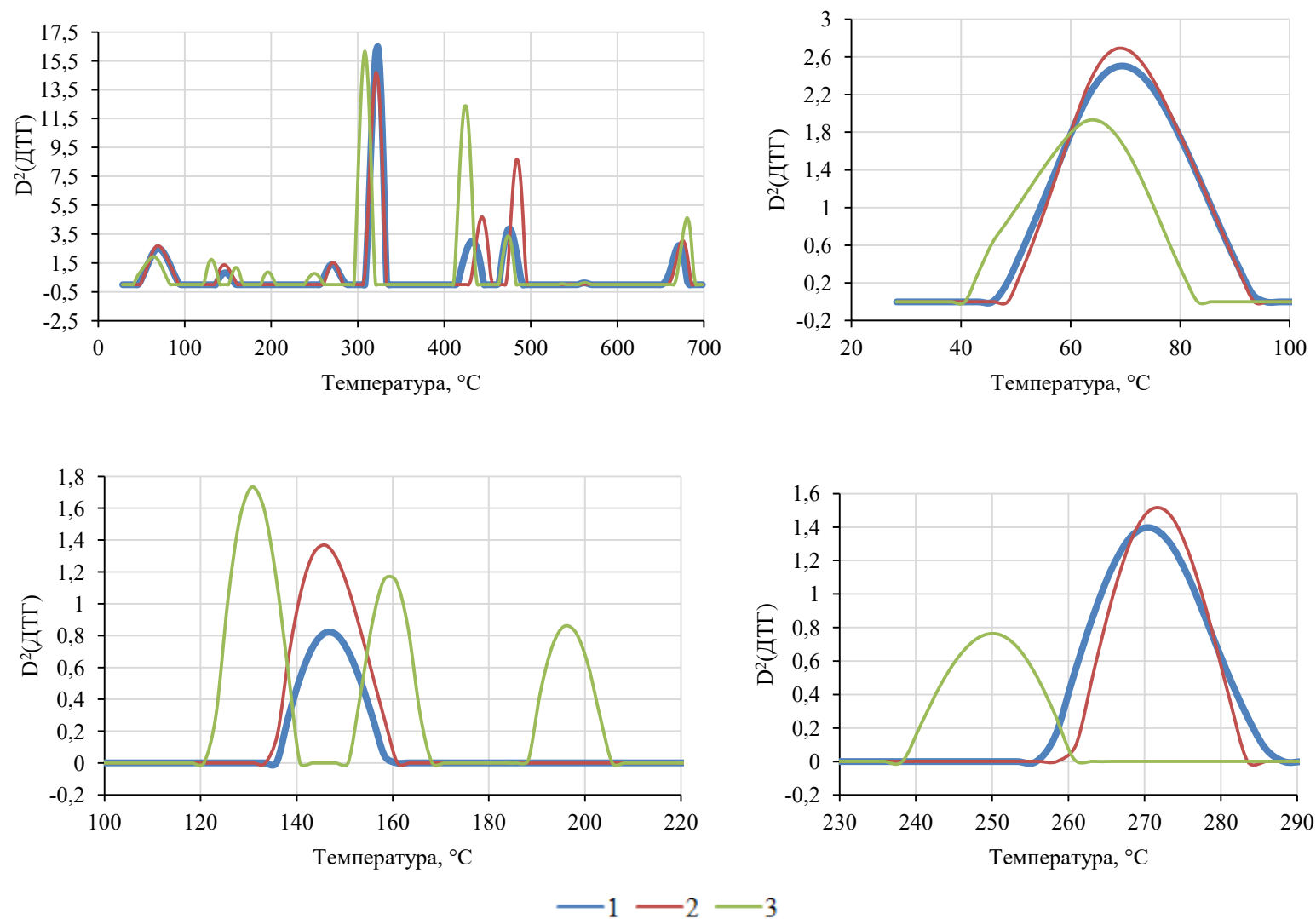
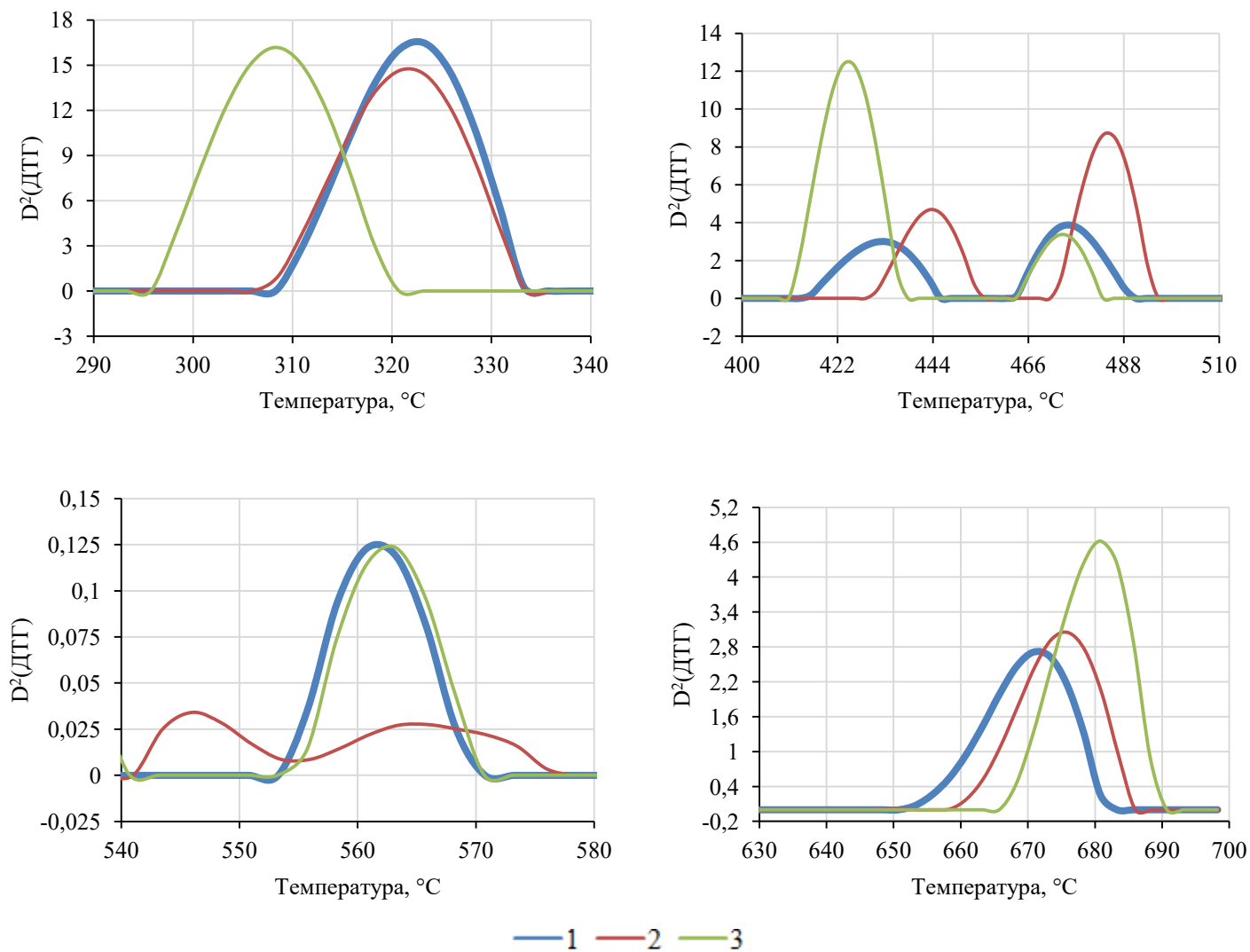


Рисунок Б.4 – ДТГ-кривые термического разложения опада после биоконверсии грибом РР-3.2 *P. pulmonarius*



1 – опад до биодеструкции; 2 – опад после биодеструкции грибом PP-3.2 *P. pulmonarius*;
 3 – опад после биодеструкции грибом Fr5-15 *F. pinicola*

Рисунок Б.5 – Вторая производная контура ДТГ по температуре



1 – опад до биодеструкции; 2 – опад после биодеструкции грибом PP-3.2 *P. pulmonarius*;
 3 – опад после биодеструкции грибом Fr5-15 *F. pinicola*

Рисунок Б.6 – Вторая производная контура ДТГ по температуре

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(обязательное)

Заключение ветлаборатории



КРАЕВОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«КРАЕВАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ»
(КГКУ «КРАЕВАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ»)
ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР

660020, г.Красноярск,
ул.Дудинская, 5 «Г»
тел. (391)220-12-84
e-mail: vetlab08@yandex.ru

RA.RU.21ПУ01
№ в реестре аккредитованных лиц

07.09.2015 г.
дата внесения сведений в реестр

Место осуществления лабораторной деятельности:
660020, г.Красноярск, ул.Дудинская, 7 (лит. Б)

УТВЕРЖДАЮ
И.о. директора КГКУ «Краевая
ветеринарная лаборатория»

Л.Н. Курочкина
«27» декабря 2021 г.



ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 9042/2021 от 27 декабря 2021 г.

Организация заказчик
(наименование):

СибГУ имени М.Ф. Решетнева

Юридический адрес:

г. Красноярск, пр. имени газеты Красноярский рабочий, д. 31

Фактический адрес:

г. Красноярск, пр. Мира, д. 82

Наименование образца: Опад после биоконверсии грибами PP-32 *Pleurotus Pulmonarius*

Основание для проведения лабораторных исследований: проверка качества

Изготовитель: не указано в заявлении

Адрес изготовителя: не указано в заявлении

Дата изготовления: не указано в заявлении

Срок годности: не указано в заявлении

Размер партии: не указано в заявлении

Количество в партии: не указано в заявлении

Место отбора: г. Красноярск, пр. Мира, д. 82

Дата и время отбора: не указано в заявлении

НД на отбор проб: -

Отбор произвел: Мамаева О.О. должность: не указано в заявлении

В присутствии: не указано в заявлении должность: не указано в заявлении

Акт отбора проб: отсутствует

Дата отбора проб: не указано в заявлении

Заявление

Дата заявления: 16.12.2021

№ сейф-пакета: -

Условия доставки: автотранспортом в изотермическом контейнере с соблюдением температурного режима

Вид упаковки: полиэтиленовый пакет

Состояние образца в момент доставки: температура в момент доставки +7,3°C, термометр инфракрасный Testo 104-IR, заводской номер 45545600, поверен до 26.10.2022г.

Масса пробы: 0,5 кг

Количество проб: 1 проба

Дата и время поступления образца: 16.12.2021 в 10:00

Даты проведения испытаний: 16.12.2021-24.12.2021

Дополнительные сведения: -

Примечание: результаты выданы на предоставленный образец, КГКУ "Краевая ветеринарная лаборатория" не несет ответственности за отбор проб и информацию, предоставленную заказчиком

Протокол испытаний № 9042/2021 от 24 декабря 2021 г.

подпись врио зав. отделом

страница 1 из 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

№ п/п	Наименование показателя, ед.изм.	НД на метод испытаний	Нормы по НД	Результат испытаний
Химико-токсикологический отдел				
5	Общая токсичность	ГОСТ 31674-2012		не токсичен
				Дата исп.: 24.12.2021

Протокол оформил: Паршина А.А.

Запрещается частичные перепечатка и копирование Протокола без письменного разрешения директора КГКУ «Краевая ветеринарная лаборатория»

Врио заведующего отделом


Заксильова Ж.В.

Заксильова Ж.В.



КРАЕВОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«КРАЕВАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ»
(КГКУ «КРАЕВАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ»)
ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР

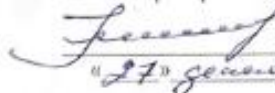
660020, г.Красноярск,
ул.Дудинская, 5 «Г»
тел. (391)220-12-84
e-mail: vetlab08@yandex.ru

RA.RU.21ПУ01
№ в реестре аккредитованных лиц

07.09.2015 г.
дата внесения сведений в реестр

Место осуществления лабораторной деятельности:
660020, г.Красноярск, ул.Дудинская, 7 (лит. Б)

УТВЕРЖДАЮ
И.о. директора КГКУ «Краевая
ветеринарная лаборатория»

 Л.Н. Курочкина
«27» декабря 2021 г.



ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 9043/2021 от 27 декабря 2021 г.

Организация заказчик
(наименование):

СибГУ имени М.Ф. Решетнева

Юридический адрес:

г. Красноярск, пр. имени газеты Красноярский рабочий, д. 31

Фактический адрес:

г. Красноярск, пр. Мира, д. 82

Наименование образца: Опад после биоконверсии грибами Fp-15 Fomitopsis Pinicola

Основание для проведения лабораторных исследований: проверка качества

Изготовитель: не указано в заявлении

Адрес изготовителя: не указано в заявлении

Дата изготовления: не указано в заявлении

Срок годности: не указано в заявлении

Размер партии: не указано в заявлении

Количество в партии: не указано в заявлении

Место отбора: г. Красноярск, пр. Мира, д. 82

Дата и время отбора: не указано в заявлении

НД на отбор проб: -

Отбор произвел: Мамаева О.О. должность: не указано в заявлении

В присутствии: не указано в заявлении должность: не указано в заявлении

Акт отбора проб: отсутствует

Дата отбора проб: не указано в заявлении

Заявление

Дата заявления: 16.12.2021

№ сейф-пакета: -

Условия доставки: автотранспортом в изотермическом контейнере с соблюдением температурного режима

Вид упаковки: полиэтиленовый пакет

Состояние образца в момент доставки: температура в момент доставки +7,3°C, термометр инфракрасный Testo 104-IR, заводской номер 45545600, поверен до 26.10.2022г.

Масса пробы: 0,5 кг

Количество проб: 1 проба

Дата и время поступления образца: 16.12.2021 в 10:00

Даты проведения испытаний: 16.12.2021-24.12.2021

Дополнительные сведения: -

Примечание: результаты выданы на предоставленный образец, КГКУ "Краевая ветеринарная лаборатория" не несет ответственности за отбор проб и информацию, предоставленную заказчиком

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

№ п/п	Наименование показателя, ед.изм.	ИД на метод испытаний	Нормы по ИД	Результат испытаний
Химико-токсикологический отдел				
5	Общая токсичность	ГОСТ 31674-2012		не токсичен
				Дата исп.: 24.12.2021

Протокол оформил: Паршина А.А.

Запрещается частичные перепечатка и копирование Протокола без письменного разрешения директора КГКУ «Краевая ветеринарная лаборатория»

Врио заведующего отделом


подпись

Закусилова Ж.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(обязательное)

Результаты культивирования грибов рода *Trichoderma*

Таблица Г.1 – Компонентный состав субстрата 2 (зеленые листья) после биодеструкции

Компонент	Штамм	Содержание, % а.с.с.			
		Продолжительность, сут			
		7	14	18	21
Вещества, экстрагируемые горячей водой	M99-9	23,2/20,9	20,1/16,5	23,9/19,1	24,9/19,8
	K6-15	21,8/19,6	19,1/16,9	23,3/19,3	22,1/17,9
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	M99-9	22,2/20,0	13,2/10,9	9,2/7,4	8,8/6,9
	K6-15	20,2/18,1	18,5/16,4	16,8/13,7	15,4/11,8
Легкогидролизуемые полисахариды	M99-9	10,5/9,5	12,8/10,5	11,3/9,1	9,8/7,8
	K6-15	11,9/10,7	14,3/12,7	12,3/10,0	10,9/8,9
Трудногидролизуемые полисахариды	M99-9	12,8/11,5	13,0/10,7	14,9/11,9	13,7/10,9
	K6-15	11,6/10,4	11,0/9,8	11,5/9,4	11,9/9,7
Лигниновые вещества	M99-9	13,8/12,4	13,1/10,8	12,8/10,3	12,2/9,7
	K6-15	12,1/9,9	10,7/9,5	9,5/7,8	9,8/7,9
Минеральные вещества	M99-9	7,2/6,5	7,3/6,0	7,2/5,8	7,0/5,6
	K6-15	7,4/6,6	7,2/6,4	7,1/5,7	6,9/5,6
Примечание – в числителе данные без учета убыли массы, в знаменателе указаны данные с учетом убыли массы					

Таблица Г.2 – Компонентный состав субстрата 5 после биодеструкции

Компонент	Штамм	Содержание, % а.с.с.			
		Продолжительность, сут			
		7 сут	14 сут	18 сут	21 сут
Вещества, экстрагируемые горячей водой	M99-9	6,2/5,9	6,8/5,9	8,3/6,8	10,1/7,9
	K6-15	5,1/4,9	6,6/5,9	5,4/4,7	8,9/7,6
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	M99-9	6,7/5,9	6,7/5,8	4,5/3,6	4,2/3,3
	K6-15	6,4/6,3	5,2/4,7	4,0/3,6	4,7/3,9
Легкогидролизуемые полисахариды	M99-9	21,8/21,0	20,1/17,6	20,7/16,9	19,3/15,9
	K6-15	22,5/21,9	22,6/20,7	21,9/19,4	20,9/17,7
Трудногидролизуемые полисахариды	M99-9	28,4/27,4	23,4/20,4	22,2/18,2	18,8/14,7
	K6-15	28,8/28,0	27,4/25,1	26,6/23,5	22,4/19,0
Лигниновые вещества	M99-9	23,2/22,4	26,6/24,2	26,2/21,4	27,1/21,2
	K6-15	24,1/23,5	24,5/22,4	25,1/22,1	25,9/22,0
Минеральные вещества	M99-9	6,5/6,2	8,0/6,1	6,7/5,5	6,9/5,4
	K6-15	6,4/6,2	6,6/6,1	6,8/5,9	5,9/5,0
Примечание – в числителе данные без учета убыли массы, в знаменателе указаны данные с учетом убыли массы					

Таблица Г.3 – Урожай конидий рода *Trichoderma*

Субстрат	Штамм	Титр, 10 ⁸ КОЕ/г				
		7 сут	11 сут	14 сут	18 сут	21 сут
п.э.о. почек	M99-9	12,7	14,9	17,7	13,1	10,7
	K6-15	15,8	16,4	17,6	16,3	15,4
опад и п.э.о. почек	M99-9	4,9	12,6	16,6	10,8	9,1
	K6-15	4,7	6,4	11,7	8,9	7,2

Таблица Г.4 – Химический состав смешанного субстрата (опад и п.э.о. почек) после биодеструкции

Компонент	Штамм	Содержание, % а.с.с.			
		7 сут	11 сут	14 сут	18 сут
Вещества, экстрагируемые горячей водой	M99-9	12,3	11,5	7,5	6,1
	K6-15	13,0	9,7	7,3	6,7
Вещества, экстрагируемые этиловым спиртом	M99-9	4,6	3,9	3,3	2,3
	K6-15	3,9	3,3	3,1	2,9
Легкогидролизуемые полисахариды	M99-9	17,1	14,4	11,0	9,6
	K6-15	14,9	13,3	12,1	11,6
Трудногидролизуемые полисахариды	M99-9	13,7	11,8	9,3	6,9
	K6-15	12,1	9,4	9,1	8,2
Лигниновые вещества	M99-9	34,7	35,5	31,1	24,9
	K6-15	33,0	28,3	28,1	28,1
Минеральные вещества	M99-9	8,2	5,2	5,4	4,3
	K6-15	7,7	6,2	5,5	5,3
Гуминовые вещества	M99-9	5,5	6,2	11,1	11,6
	K6-15	5,2	5,8	7,2	9,1

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

(информационное)

Изучение стимулирующего эффекта водоекстрактивных веществ листьев тополя на прорастание семян сосны обыкновенной в грунте

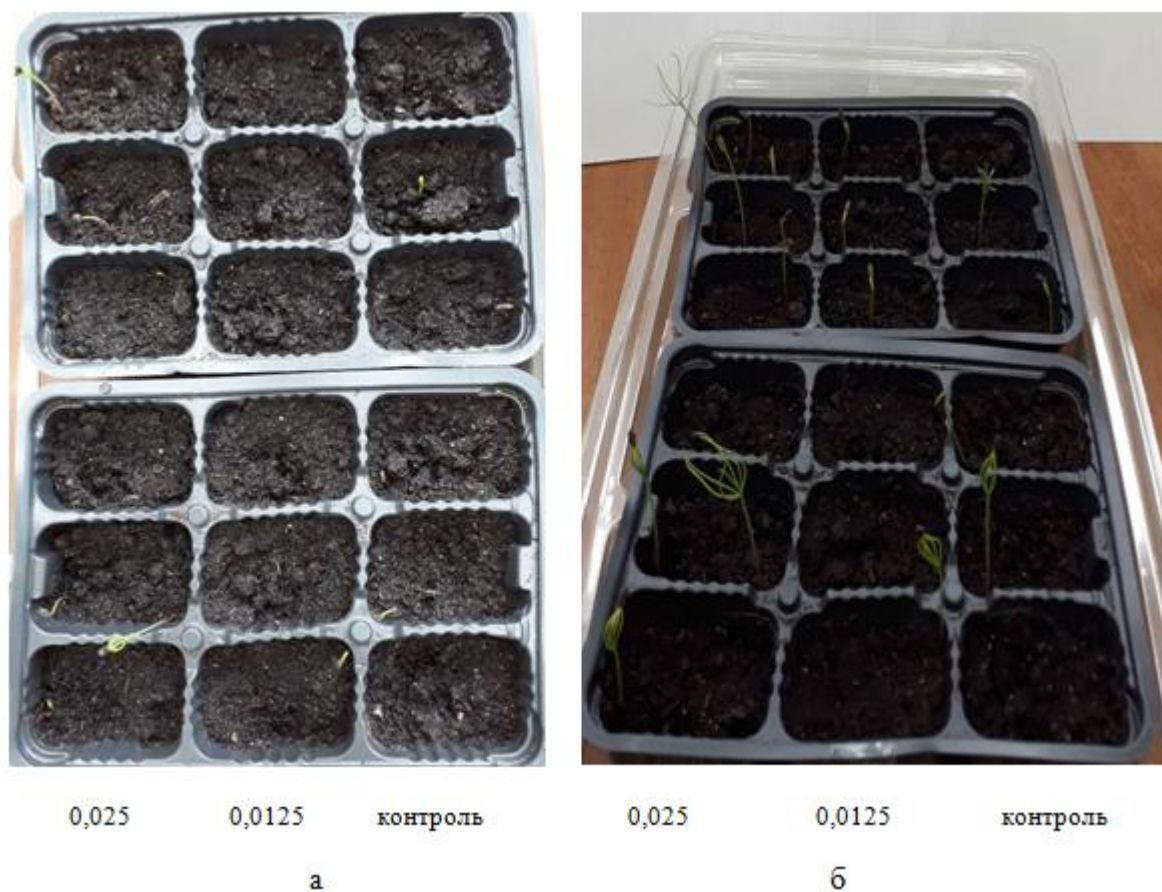


Рисунок Д.1 – Фото эксперимента на 10-й (а) и 13-й день (б) проращивания семян сосны в грунте

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

(обязательное)

Определение условий культивирования базидиальных грибов

Таблица Е.1 – Матрица планирования эксперимента

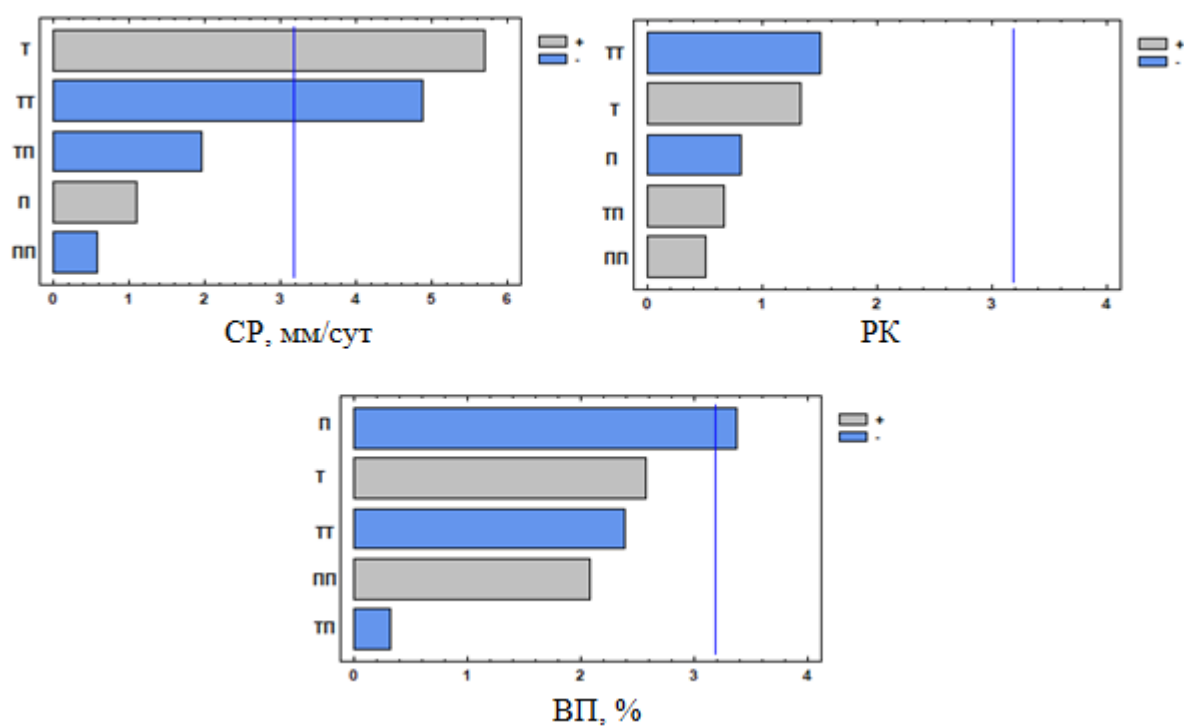
Уровни фактора		Fp5-15 <i>F. pinicola</i>			PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>		
		СР мм/сут	РК	ВП, %	СР мм/сут	РК	ВП, %
1-2мм	1	2,9	11,4	96,49	3,3	28,3	89,7
	1	2,8	11,2	96,8	3,1	26,9	89,9
	1	2,8	11,3	96,2	3,3	27,9	89,4
3-4 мм	2	3,4	16,9	94,4	3,7	32,4	91
	2	3,3	15,2	94,7	3,6	30,9	91,4
	2	3,2	16,1	94,9	3,6	31,4	90,7
5-6 мм	3	3,2	14,8	94,8	4,1	36,2	90,9
	3	3,3	15,5	93	4,1	36,2	91,1
	3	3,5	17,1	93,7	4,2	35,9	90,7
7-8 мм	4	3,7	18,2	95,3	3,5	30,3	92,9
	4	3,6	17,1	95,1	3,4	28,8	93,6
	4	3,7	18,2	95,4	3,5	30,2	92,4
10-12 мм	5	3,3	16,9	96,3	3,6	31,1	94,4
	5	3,3	16,3	96,6	3,9	33,8	94,6
	5	3,3	17,8	96	3,7	32,2	94,2

Таблица Е.2 – Матрица планирования эксперимента влияния температуры и продолжительности на рост грибов, культивируемых на опаде

Т, °С	П, сут	Fp5-15 <i>F. pinicola</i>			PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>		
		СР мм/сут	РК	ВП, %	СР мм/сут	РК	ВП, %
30	12	3,5	14	95,1	3,8	45,8	91,1
20	12	2,3	9,4	94,6	2,8	33	89,7
30	8	4,3	17	98,9	3,5	42,1	97,9
20	8	2	15,7	98,3	2,5	30	95,5
30	10	4,2	16,8	96,7	3,7	44,5	95,2
20	10	1,9	7,4	96,2	2,5	29,7	91,8
25	12	3,5	14	95,3	3,5	42	91,36
25	8	4,3	17,3	98,6	4,1	49	97,1
25	10	4,2	16,8	96,8	4,2	50,4	95,9

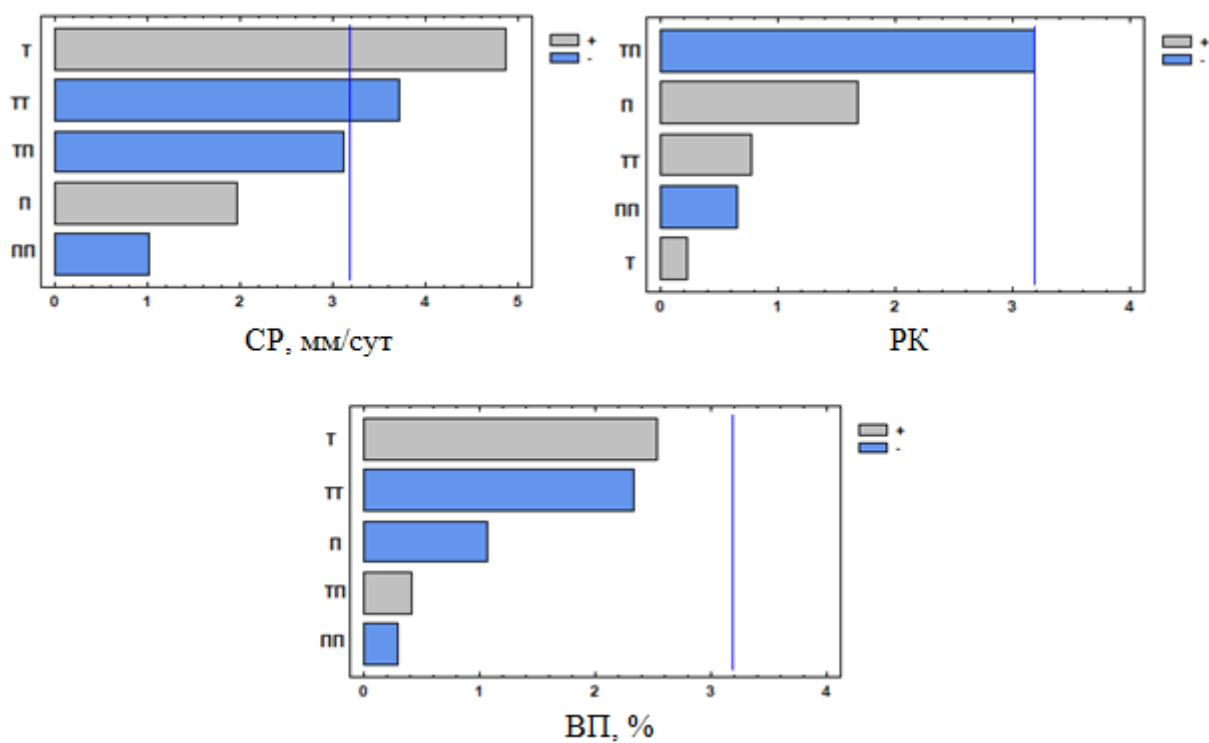
Таблица Е.3 – Матрица планирования эксперимента влияния температуры и продолжительности на рост грибов, культивируемых на п.э.о. зеленых листьев

Т, °С	П, сут	Fp5-15 <i>F. pinicola</i>			PP-3.2 <i>P. pulmonarius</i>		
		СР мм/сут	РК	ВП, %	СР мм/сут	РК	ВП, %
30	12	3,5	28	91,5	3,5	63	87,2
20	12	3,3	39,3	89,7	2,9	52,3	89,2
30	8	4,2	33,5	96	2,4	42,6	94,4
20	8	2,7	31,9	94,4	2,4	42,6	94,8
30	10	4,2	33,6	93,9	3,8	67,7	90,3
20	10	2,8	33,4	92,1	2,4	43,1	93,2
25	12	3,8	30,6	91,4	3,5	63	86,44
25	8	4	32,3	95,3	4,2	74,8	93,8
25	10	4,2	33,6	93,3	4,2	75,6	89,7



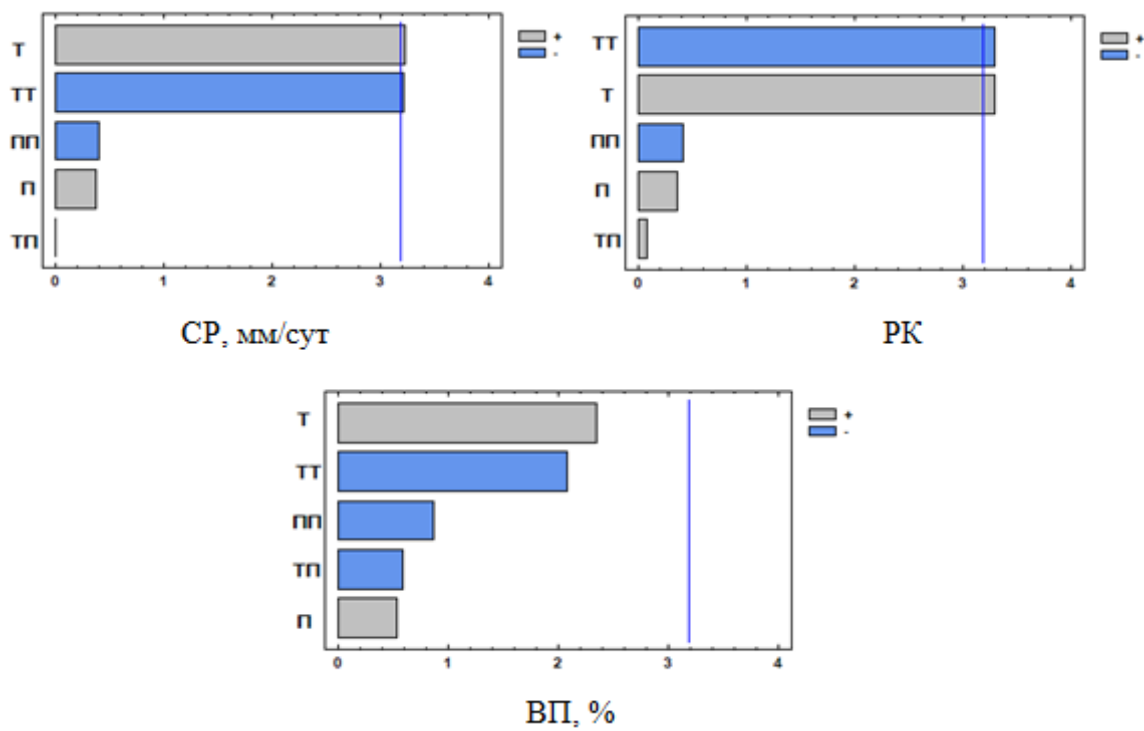
Т – температура, °С; П – продолжительность, сут

Рисунок Е.1– Диаграмма Парето для выходного параметра СР, РК, ВП гриба Fp5-15 *F. pinicola* на опавших листьях



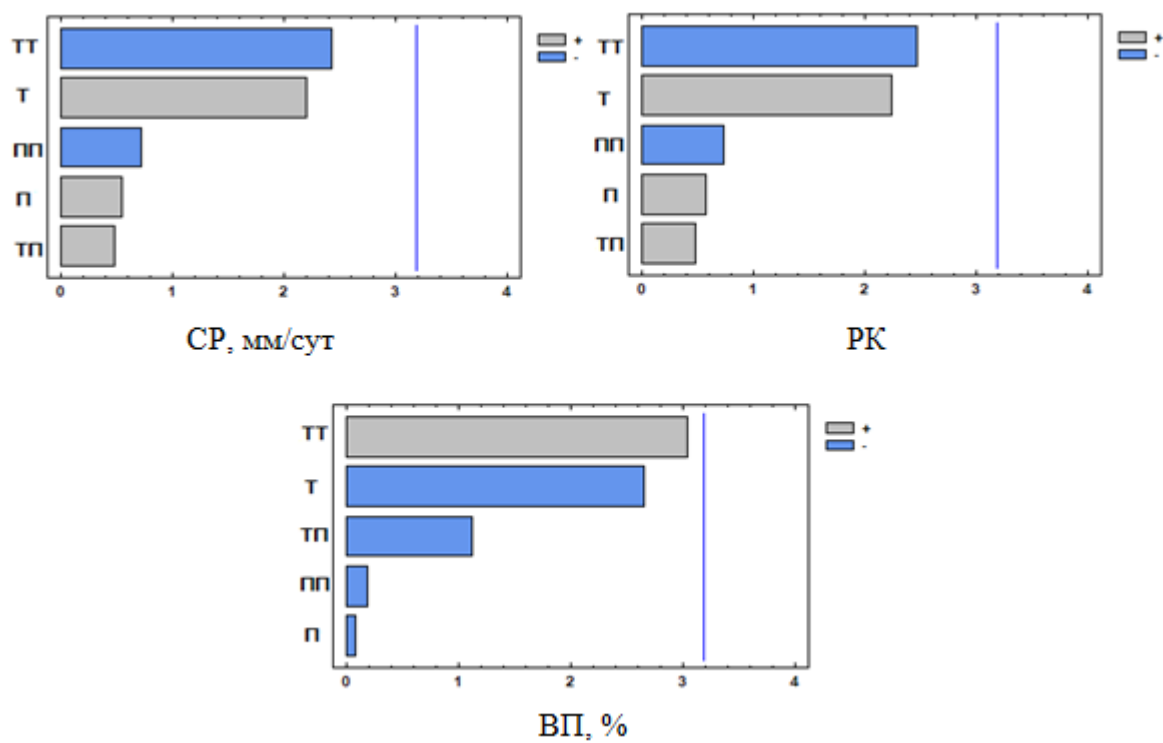
Т – температура, °С; П – продолжительность, сут

Рисунок Е.2 – Диаграмма Парето для выходного параметра СР, РК, ВП гриба РР-3.2 *P. pulmonarius* на опавших листьях



Т – температура, °С; П – продолжительность, сут

Рисунок Е.3 – Диаграмма Парето для выходного параметра СР, РК, ВП гриба Fp5-15 *F. pinicola* п.э.о. на зеленых листьях



Т – температура, °С; П – продолжительность, сут

Рисунок Е.4 – Диаграмма Парето для выходного параметра СР, РК, ВП гриба РР-3.2 *P. pulmonarius* п.э.о. на зеленых листьях