

На правах рукописи

АСТРАХАНЦЕВА МАРИЯ НИКОЛАЕВНА



**ИНТЕНСИФИКАЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА *BACILLUS SUBTILIS*
И *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ
ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
МИЛЛИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА И КОМПЛЕКСОНА
ГИДРОКСИЭТИЛИДЕНДИФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ**

03.00.23 - Биотехнология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Казань 2006

Работа выполнена на кафедре пищевой биотехнологии
Казанского государственного технологического университета

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Гамаюрова Валентина Семеновна

Официальные оппоненты:
доктор технических наук, профессор
Николаев Николай Алексеевич
доктор физико-математических наук, профессор
Бецкий Олег Владимирович

Ведущая организация:
Институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Защита состоится «27» декабря 2006 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.080.02 при Казанском государственном технологическом университете по адресу: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 68, КГТУ, Зал заседаний Ученого совета (А-330).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государственного технологического университета.

Автореферат разослан «27» ноября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



А.С. Сироткин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы: Микроорганизмы являются неотъемлемой частью производственных процессов, используемых в биотехнологии, в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве. Поэтому стимуляция их роста, улучшение технологических показателей, а также оптимизация процессов культивирования этих микроорганизмов на сегодняшний день представляются актуальными задачами. Решение этих задач имеет огромное практическое значение.

Одним из возможных путей стимуляции роста микроорганизмов является введение в среду хелатирующих агентов. Известна интенсификация процессов метаболизма у микробов при использовании комплексных соединений металлов с биологически активными комплексами. Среди многих комплексонов особый интерес представляют бифосфоновые кислоты — структурные аналоги пиродифосфата, являющегося природным регулятором кальциевого обмена.

В настоящее время большой интерес представляет комплексон гидроксипиридиндифосфоновая кислота (ОЭДФ). Этот комплексон обладает высокой специфичностью взаимодействия с рядом важных катионов, содержит две фосфоновые группы и оксипиридиновую группу, способные к комплексообразованию. Кроме того, ОЭДФ разрешена к применению в пищевой промышленности.

Наряду с применением биохимических агентов, актуальным является использование физических факторов для воздействия на рост и физиологическую активность микроорганизмов, применяющихся в промышленности.

Пристальное внимание в последнее время уделяется рассмотрению возможности использования электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) миллиметрового диапазона (мм диапазона) как средства стимуляции биологических процессов. Этот вид излучений может оказывать значительное действие на различные биологические объекты, в том числе и на микроорганизмы. Причем, последние в этом аспекте наименее изучены. При правильном подборе параметров излучения, его применение позволяет существенно расширить возможности регулирования процессов метаболизма у микробных культур. Применение ЭМИ мм диапазона не оказывает отрицательного действия на окружающую среду, не оставляет токсичных отходов, оно безопасно для жизнедеятельности человека.

Объектами исследований в данной работе явились бактерии *Bacillus subtilis* и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Выбор именно этих объектов обусловлен несколькими причинами. Эти микроорганизмы находят широкое применение во многих областях народного хозяйства. Бактерии *Bacillus subtilis* 26D используются как основа при производстве биологически активного препарата для защиты растений. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* 509 активно применяются в пищевой промышленности, в частности в хлебопечении.

Кроме того, эти микроорганизмы занимают различное таксономическое положение. Бактерии *Bacillus subtilis* 26D являются представителями прокариотических организмов, а дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* 509 относятся к эукариотам.

В руководстве диссертационной работой принимала участие к.б.н., доцент кафедры Пищевой биотехнологии Крыпанца А.Ю.

Цель работы: Улучшение ростовых и технологических показателей культур дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 509 и бактерий *Bacillus subtilis* 26D путем применения комплекса ОЭДФ и ЭМИ КВЧ. Подбор оптимальных значений концентрации указанного комплекса и оптимальных параметров излучения для последующего внедрения данных методов стимуляции в промышленность.

Научная новизна: Выявлено влияние комплекса ОЭДФ в широком диапазоне концентраций на ростовые и технологические характеристики *Bacillus subtilis* 26D и *Saccharomyces cerevisiae* 509.

Впервые проведено изучение влияния ЭМИ КВЧ в широком частотном диапазоне 53,5-54,5 ГГц и 61,0-63,0 ГГц на рост бактерий *Bacillus subtilis* 26D (прокариоты) и хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 509 (эукариоты).

Показано, что используемые химический (комплекс ОЭДФ) и физический (ЭМИ КВЧ) факторы могут оказывать на микробные культуры как стимулирующее, так и ингибирующее действие. Характер этого действия зависит от количественной характеристики фактора (концентрация комплекса, частота ЭМИ КВЧ).

Методом ЯМР-релаксометрии проведен структурно-динамический анализ биополимеров клеток, подвергнутых различным воздействиям. Впервые показано, что ЭМИ КВЧ оказывает одновременное влияние на биополимеры, локализованные как в клеточных оболочках, так и в протоплазме. Установлено, что комплексобразующий агент ОЭДФ в зависимости от концентрации неодинаково влияет на биополимеры клеточных оболочек и протоплазмы.

Практическая значимость: В результате исследований были установлены оптимальные для каждой культуры микроорганизмов концентрации комплекса. Показана возможность успешного применения комплекса ОЭДФ в процессе ферментации бактерий *Bacillus subtilis* 26D с целью усиления их биологической активности.

Получена опытная партия модифицированного препарата для защиты растений «Фитоспорин». Проведены опытно-промышленные испытания препарата для защиты растений, на основе бактерий *Bacillus subtilis* 26D, выращенных в присутствии оптимальной концентрации комплекса. Выявлено улучшение посевных качеств семян пшеницы, обработанных этим препаратом. При использовании данного препарата в вегетативный период наблюдалось увеличение его фунгицидной активности, что выражалось в снижении пораженности растений корневыми гнилями, мучнистой росой и бурой ржавчиной.

Показано, что использование ЭМИ КВЧ миллиметрового диапазона для облучения бактерий *Bacillus subtilis* 26D и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 509 приводит к улучшению технологических показателей. Данный метод может быть рекомендован для использования в пищевой промышленности и в производстве БАВ.

Получена опытная партия модифицированного препарата для защиты растений, посевной материал для которого предварительно был обработан ЭМИ КВЧ со стимулирующей частотой. Результаты полевых испытаний показали целесообразность использования этого препарата для защиты растений. При обработке семян

пшеницы этим препаратом улучшается всхожесть, снижается пораженность болезнями. При обработке препаратом растений огурцов, гвоздик, каллов выявлено, что этот препарат обладает высокой антагонистической активностью по отношению к возбудителям корневых гнилей и фитофтороза.

Показано, что применение модифицированного препарата повышает иммунитет растений, увеличивает урожайность овощных культур.

Выпущена опытная партия хлебопекарных дрожжей, посевной материал для которой предварительно подвергся обработке ЭМИ КВЧ стимулирующей частоты. Отмечено увеличение выхода биомассы дрожжей от потребленной мелассы. Технологические показатели выпущенных дрожжей соответствуют ГОСТ 171-81. Акты об опытно-промышленных испытаниях приведены в приложениях к диссертационной работе.

Апробация работы: Результаты работы были доложены на IX Международной конференции молодых ученых «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений» (Казань, 1998), на второй Межрегиональной конференции «Пищевая промышленность-2000» (Казань, 1998), на Всероссийских конференциях молодых ученых «Пищевые технологии» (Казань, 1998, 2001, 2002, 2005), на V Международной научной конференции «Методы кибернетики химико-технологических процессов» (Казань, 1999), на IV Республиканской конференции «Актуальные экологические проблемы республики Татарстан» (Казань, 2000), на международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы развития прикладных исследований и пути повышения их эффективности в сельскохозяйственном производстве» (Казань, 2001), на конференции «Экологические проблемы города Казани» (Казань, 2001), на первом форуме молодых ученых и специалистов РТ (Казань, 2001), на объединенной международной научной конференции «Новая геометрия природы» (Казань, 2003), на ежегодных научных сессиях Казанского государственного технологического университета (Казань, 2001, 2003, 2004), на XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003), на II и III московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2003, 2004), на всероссийской научно-технической конференции-выставке «Высокоэффективные пищевые технологии, методы и средства для их реализации» (Москва, 2004).

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 15 работ.

Объем и структура работы: диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и библиографического указателя (183 наименования источников), приложений. Работа изложена на 150 страницах машинописного текста, включает в себя 9 таблиц, 12 рисунков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали два вида микроорганизмов, имеющих промышленное значение, относящихся к различным таксономическим группам. Прокариоты представлены бактериями *Bacillus subtilis* 26D, которые применяются при производстве биологически активного препарата для защиты растений. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* раса 509, используемые в хлебопекарной промышленности, представители эукариот. Культивирование микроорганизмов осуществлялось периодическим способом. Для ферментации бактерий использовали питательную среду на основе пшеничных отрубей, дрожжи культивировали на глюкозо-аммонийной среде. Для экспериментов использовались культуры, находящиеся в конце экспоненциальной фазы роста.

Растворы комплексона ОЭДФ вносили в виде водных растворов. Контролем служила микробная культура, выращенная в условиях, аналогичных опытному без внесения раствора комплексона.

Облучение опытных культур ЭМИ КВЧ проводили с использованием частотного генератора ГЧ-142. Параметры излучения (мощность излучения – 50 мВт/см², время экспозиции – 5 мин, расстояние от рупора излучателя до объекта – 10 см), кроме изменяемых частотных характеристик, оставались постоянными для всех опытов. Контролем служила микробная культура, выращенная в условиях, аналогичных опытному, и не подверженная действию облучения.

Концентрацию биомассы определяли методом высушивания до постоянного веса (по абсолютно сухой биомассе) и турбидиметрическим методом. Концентрацию белка в культуральной жидкости определяли биуретовым методом. Количество редуцирующих веществ определяли с помощью стандартных методик – методом Бертрана и фенол-серниокислотным методом. Технологические характеристики дрожжей определяли по стандартным методикам, применяемым в дрожжевом производстве.

Все эксперименты проводили не менее, чем в пяти повторностях. При статистической обработке экспериментальных данных использовали программный продукт Statistika 6.0 для описательной статистики, с помощью которого рассчитывался параметрический критерий Стюдента, а так же проводилась проверка гипотез на статистическую достоверность результатов эксперимента. Все приведенные в автореферате экспериментальные данные статистически достоверны.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование влияния комплексона на рост микробных культур Действие комплексона ОЭДФ на бактериальную культуру *Bacillus subtilis*

На первом этапе рассматривали влияние различных концентраций комплексона на состав питательной среды. Комплексон вводили на различных стадиях приготовления среды.

Одной из наиболее экономически выгодных промышленных питательных сред для культивирования *Bacillus subtilis* является среда на основе пшеничных отрубей. Пшеничные отруби представляют достаточно стойкий комплекс полисахаридов, белков и минеральных веществ, что вызывает необходимость использования дополнительных методов для повышения степени извлечения питательных веществ из отрубей. Принимая во внимание стабилизирующую роль катионов, в частности катионов кальция, была исследована возможность использования для этих целей комплексообразующего агента ОЭДФ.

Анализ полученных результатов показал, что изменение содержания редуцирующих веществ и белка в средах на разных стадиях их приготовления в зависимости от концентрации комплексона происходит неодинаково. После стадии заваривания изменения концентраций редуцирующих веществ и белка носят прямо противоположный характер. Максимумы выделения РВ соответствуют минимумам образования белков. Аналогичная картина наблюдается и на стадии автоклавирования. В зависимости от концентрации комплексона, вносимого в среду на стадии ее приготовления, можно получить среды с повышенным содержанием белка, либо увеличить содержание редуцирующих веществ. Таким образом, комплексон ОЭДФ можно рассматривать как инструмент изменения состава питательной среды в процессе ее приготовления.

Культивирование бактерий на средах, приготовленных с использованием комплексообразующего агента, показало незначительное отличие достигнутого уровня биомассы по сравнению с контролем (прирост на 6%). При увеличении концентрации комплексона выше 2 г/л наблюдается резкое ингибирование роста. Очевидно, в этой области происходит объединение действия двух неблагоприятных факторов — высокой концентрации белка в составе питательной среды и непосредственного действия комплексона на микробную клетку.

С целью изучения прямого влияния ОЭДФ на рост *Bacillus subtilis* комплексон вносили в готовую питательную среду стандартного состава параллельно с посевным материалом (рис.1).

Обнаружен заметный эффект стимуляции при добавлении комплексона в концентрации 2 г/л. В целом прослеживается та же тенденция, что и для случая, когда комплексон вносили на стадии приготовления питательных сред: при содержании ОЭДФ ниже 2 г/л концентрация биомассы незначительно отличается от контрольного уровня, а превышение 2 г/л приводит к ингибированию роста культуры. Причем

ингибирование при внесении комплексона в готовую среду выражено в меньшей степени.

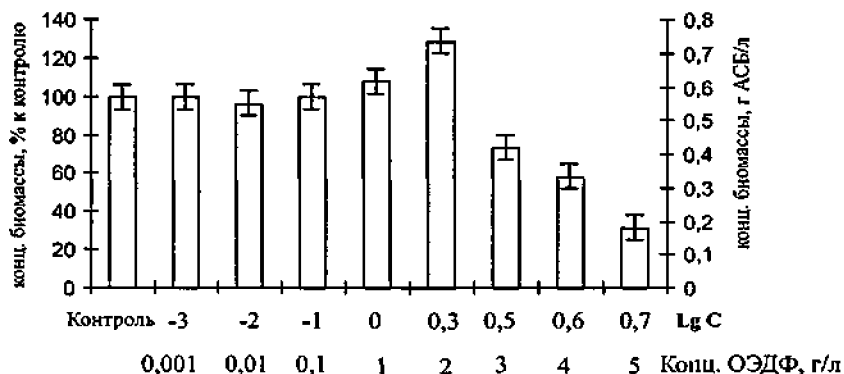


Рисунок 1 – Уровень биомассы *Bacillus subtilis* в зависимости от концентрации комплексона ОЭДФ (комплексон вносили параллельно с инокулятом)

Исходя из полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод о целесообразности использования ОЭДФ для повышения прироста биомассы *Bacillus subtilis*. Предлагается вводить комплексообразующий агент в готовую питательную среду параллельно с инокулятом в концентрации 2 г/л.

Действие комплексона ОЭДФ на дрожжевую культуру *Saccharomyces cerevisiae*

Зависимость концентрации биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса 509 в целом носит экстремальный характер с максимумом в точке, соответствующей концентрации ОЭДФ 0,01 г/л (рис.2). Обнаружено, что внесение в среду комплексона в стимулирующих концентрациях не влечет за собой ухудшения технологических показателей, как органолептических, так и физико-химических. Для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 509, выращенных в присутствии комплексона ОЭДФ в стимулирующей концентрации, отмечено, что подъемная сила, зимазная и мальтазная активности не ниже, чем у контрольных дрожжей, и находятся в пределах, определяемых ГОСТом 171-81 как «хорошее» качество дрожжей.

Для определения непосредственного влияния ОЭДФ на дрожжевые клетки был проведен их структурно-динамический анализ импульсным методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (табл.1).

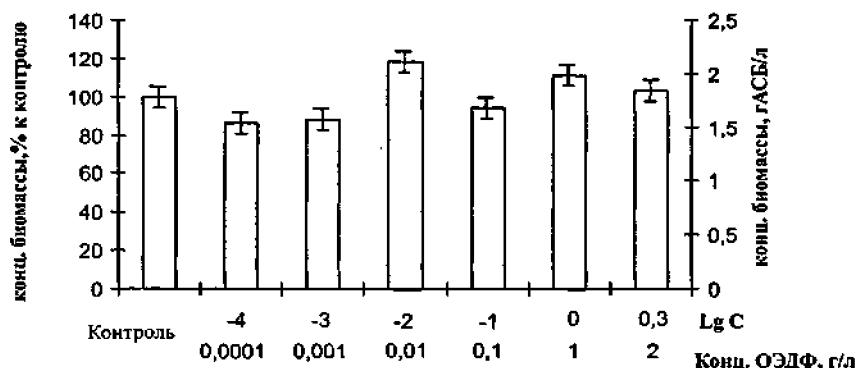


Рисунок 2- Уровень биомассы *Saccharomyces cerevisiae* 509 в зависимости от концентрации комплекса ОЭДФ

Таблица 1
 Параметры ЯМР-релаксации биомассы дрожжей, выращенной в присутствии комплекса

Концентрация ОЭДФ, г/л	i	Время спин-спиновой релаксации T_{2i} , мс	Населенности (относительное содержание) протонов с $T_2=T_{2i}$, P_i , %
Контроль	1	-	-
	2	0,135	38
	3	0,018	62
0,01	1	-	-
	2	0,134	37
	3	0,015	63
0,001	1	-	-
	2	0,085	40
	3	0,019	60

Анализируя полученные значения времен спин-спиновой релаксации T_{2i} и населенностей P_i фаз, принимая во внимание природу высокомолекулярных соединений, образующих оболочки дрожжевых клеток, а так же опираясь на литературные данные о временах релаксации отдельных химических соединений можно предположить следующее. Фаза, характеризующаяся релаксационными параметрами T_{22} и P_2 , сформирована либо гибкоцепными (макро)молекулами, либо их водными растворами или комплексами. Учитывая строение микробных клеток, можно предполагать, что эта фаза характеризует поведение протоплазмы. Третья фаза (T_{23} , P_3) с наиболее коротким временем спин-спиновой релаксации, характерным для жесткоцепных по-

лимеров (в том числе - для производных целлюлозы), закономерно связана с поведением твердopodobных высокомолекулярных соединений в основном сосредоточенных в составе клеточных стенок.

По результатам проведенного анализа можно сделать вывод, что влияние комплексонов на оболочки дрожжевых клеток оказывается весьма противоречивым: ингибирующая концентрация комплексона никак не затрагивает клеточную оболочку как таковую, но подавляет активность протоплазмы, по-видимому, вследствие проникновения комплексона внутрь протоплазмы через клеточную оболочку. И наоборот, стимулирующая концентрация комплексона (на порядок превышающая ингибирующую) оказывает влияние на клеточную оболочку, почти не затрагивая протоплазму.

Результаты экспериментов показали, что использование оптимальной концентрации комплексона ОЭДФ 0,01 г/л позволяет значительно повысить выход дрожжей при сохранении их качества.

2. Исследование влияния ЭМИ миллиметрового диапазона на рост микробных культур

Влияние ЭМИ КВЧ в диапазоне частот 53,47-54,57 ГГц на рост бактерий *Bacillus subtilis*

Зависимость изменения концентрации биомассы от частоты излучения при постоянстве всех остальных параметров носит выраженный острорезонансный характер (рис.3). Явление резонансного отклика микробных культур на действие ЭМИ КВЧ отмечалось ранее в работах Девяткова Н.Д. и Бецкого О.В. Максимальная величина концентрации биомассы (на 30 % превышает контрольное значение) была достигнута при воздействии на культуру ЭМИ с частотой 53,77 ГГц.

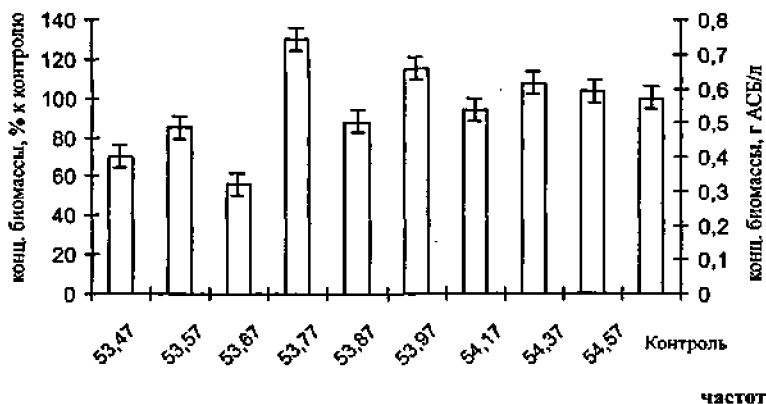


Рисунок 3 - Зависимость концентрации биомассы *Bacillus subtilis* от частоты облучения в диапазоне 53.47-54.47 ГГц.

Эффективность использования сахаров для роста биомассы выше на 15,8% для культуры, подвергнутой облучению с частотой 53,77 ГГц, по отношению к контролю. Эффективность потребления субстрата у бактерий, подвергнутых воздействию ЭМИ с частотой 53,67 ГГц (ингибирующая), снизилась по сравнению с контрольным уровнем более чем в два раза. Следовательно, путем воздействия ЭМИ определенной частоты, можно моделировать изменение концентрации биомассы, а также эффективность ее образования.

Культура бактерий *Bacillus subtilis* используется в сельском хозяйстве для защиты растений. Один из механизмов биоцидного действия этих бактерий связан с выделением ими веществ полипептидной природы. Анализ изменения концентрации белка в составе культуральной жидкости показывает, что в процессе роста его содержание в культуральной жидкости нарастает для всех исследованных образцов. Однако при воздействии стимулирующей частотой экскреция белка незначительно превышает контрольное значение, а при воздействии ингибирующей частотой 53,67 ГГц концентрация белка заметно выше контроля.

Таким образом, обнаружено, что воздействие ЭМИ в частотном диапазоне 53,47-54,57 ГГц приводит к изменению метаболизма бактерий *Bacillus subtilis*. Обнаружена оптимальная в исследуемом диапазоне частота облучения – 53,77 ГГц, при которой происходит улучшение всех показателей роста бактериальной культуры, включая концентрацию биомассы, эффективность ее образования и выделение полипептидных биоцидов. В литературе имеются данные о влиянии ЭМИ КВЧ в близком частотном диапазоне на микробный метаболизм. Однако объектами исследований являлись бактерии *Bacillus birmus*.

Влияние ЭМИ КВЧ в диапазоне частот 53,47-54,57 ГГц на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Кривую изменения концентрации биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 509 в зависимости от частоты облучения при постоянстве остальных параметров можно представить как экстремальную (рис. 4). Экстремум полученной зависимости приходится на частоту облучения равную 54,17 ГГц. В этом случае достигнута максимальная величина прироста биомассы – 36% по отношению к контролю.

Изучение технологических показателей продемонстрировало, что подъемная сила опытных дрожжей, облученных стимулирующей частотой 54,17 ГГц, увеличилась на 33 % по сравнению с контролем. Уровень зимазной активности, зарегистрированный в опытном варианте, составил 60 минут при величине в 45 минут этого показателя для контрольных дрожжей. Это свидетельствует о снижении активности ферментов утилизации глюкозы, однако оба показателя лежат в пределах, допускаемых ГОСТом 171-81. Вместе с тем, на 34% увеличился уровень мальтазной активности. Результаты определения осмочувствительности опытного и контрольного образцов не различаются.

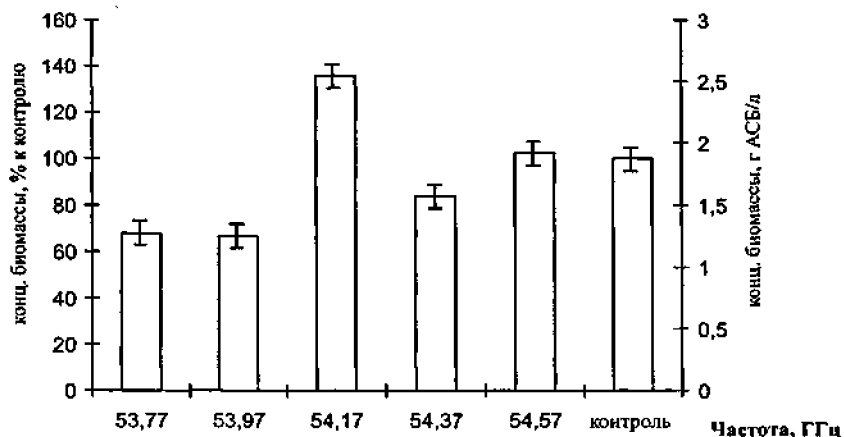


Рисунок 4 – Концентрация биомассы *Saccharomyces cerevisiae* в зависимости от частоты облучения в диапазоне 53.77 ГГц-54.57 ГГц

С целью выявления влияния ЭМИ КВЧ непосредственно на структуру микробной клетки был проведен структурно-динамический анализ методом ЯМР-релаксометрии (табл. 2). Фаза T_{21} (с населенностью P_1) соответствует молекулам воды, связанным (сорбированным) на внешней поверхности клеток. Интерпретация характеристик двух других фаз не отличается от предложенной ранее.

Таблица 2

Параметры ЯМР-релаксометрии биомассы дрожжей, подвергнутой воздействию ЭМИ КВЧ

Частота ЭМИ КВЧ, ГГц	i	Время спин-спиновой релаксации T_{21} , мс	Населенности (относительное содержание) протонов с $T_2 = T_{21}$, P_i , %
Контроль	1	19,6	70
	2	0,22	12
	3	0,020	18
54,17	1	19,5	43
	2	0,28	23
	3	0,024	34
53,97	1	11,6	77
	2	0,14	10
	3	0,018	13

Анализируя данные ЯМР можно предположить, что происходит одновременное воздействие излучения на динамику конформационных переходов и на соотно-

шение конформеров в составе биополимеров независимо от места их локализации. Это закономерно приводит к перераспределению свободного объема в системе и (или) активизации одной из возможных изомерных форм у склонных к таутомерным переходам реакционно-способных центров клетки.

Таким образом, при ингибировании происходит падение активности большинства компонентов клеточной структуры. В то же время при стимулировании создаются благоприятные условия для повышения активности протоплазмы, в том числе за счет роста проницаемости цитоплазматической мембраны и сокращения периплазматического пространства.

По результатам проведенного эксперимента можно сделать вывод, что облучение ЭМИ оптимальной в исследуемом диапазоне частотой 54,17 ГГц приводит в целом к улучшению качества дрожжей. В работах Брюховой А.К. с соавторами показана возможность использования ЭМИ КВЧ в аналогичном частотном диапазоне для улучшения технологических характеристик пивоваренных дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*.

Влияние ЭМИ КВЧ в диапазоне частот 61,0-63,0 ГГц на рост бактерий *Bacillus subtilis*

Полученный график зависимости уровня накопления биомассы от частоты облучения (рис.5) носит, как и в ранее проведенных экспериментах, резонансный характер, который в большей степени проявляется в области частот выше 62 ГГц. Максимальная величина прироста биомассы (30% по отношению к контролю) была достигнута при воздействии ЭМИ с частотой 63,0 ГГц.

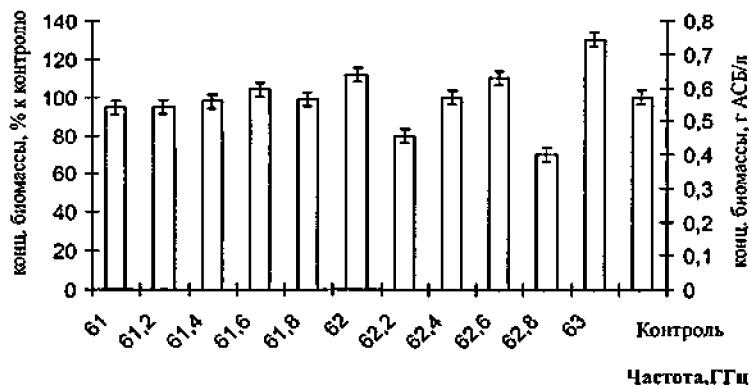


Рисунок 5 - Зависимость концентрации биомассы *Bacillus subtilis* от частоты облучения в диапазоне 61,0-63,0 ГГц)

Выход по субстрату для культуры, облученной стимулирующей частотой превышает контрольное значение на 10,7%. Выход по субстрату у культуры, облученной ингибирующей частотой, составил всего 48% от выхода контрольной культуры.

Результаты анализа культуральной жидкости показывают значительное увеличение концентрации белка во всех образцах. Этот показатель у облученной ЭМИ с частотой 63,0 ГГц культуры значительно выше контрольного. Однако, концентрация белка, выделенного культурой, облученной ингибирующей частотой, тоже превышает контрольное значение.

Результаты данной серии экспериментов показали, что в исследуемом диапазоне частот стимулирующей является частота 63,0 ГГц. При действии этой частоты на микробную культуру происходит заметное увеличение уровня накапливаемой биомассы. Эффективность потребления сахаров находится так же на высоком уровне. Кроме того, возрастает экскреция веществ полипептидной природы в культуральную жидкость.

Влияние ЭМИ КВЧ в диапазоне частот 61,0-63,0 ГГц на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Характер полученной зависимости уровня накопления биомассы дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* 509 от частоты облучения сходен с подобной для бактериальной культуры. На всем протяжении рассматриваемого частотного спектра наблюдается явление резонанса (рис.6).

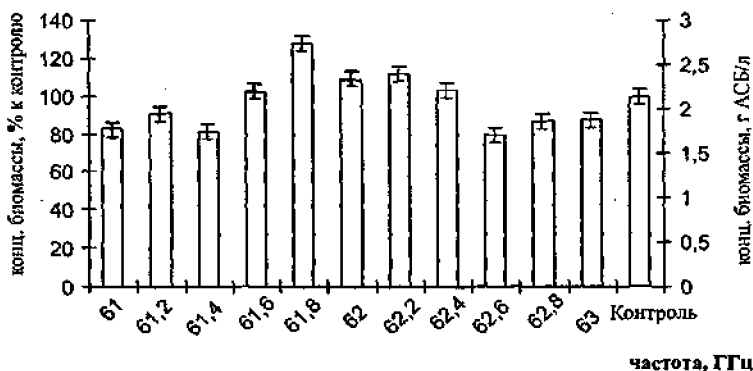


Рисунок 6 – Зависимость концентрации биомассы *Saccharomyces cerevisiae* от частоты облучения в диапазоне 61,0-63,0 ГГц

Максимальный стимулирующий эффект наблюдается при действии на дрожжи ЭМИ с частотой 61,8 ГГц. Прирост биомассы в этом случае составил 28% по отношению к контролю.

Оптимальная частота в исследуемом диапазоне оказывает сходное действие на технологические показатели дрожжевой культуры, как в ранее изученном диапазоне (частота 54,17 ГГц). Подъемная сила облученных дрожжей на 43% превышает аналогичный показатель контрольных дрожжей. Обращает на себя внимание тот факт, что, как и в другом частотном диапазоне, зимазная активность облученных дрожжей не только не превышает контрольного уровня, но и на 20% ниже этого показателя. А мальтазная активность облученной культуры на 40% выше, чем у контрольных дрожжей.

По совокупности полученных результатов можно сделать заключение о том, что частоту 61,8 ГГц для культуры дрожжей можно считать оптимальной. При воздействии этой частотой происходит значительное увеличение прироста биомассы по сравнению с контролем, а так же в целом улучшаются технологические характеристики культуры.

ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Полученные экспериментальные результаты нашли подтверждение в ходе опытно-промышленных испытаний.

1. Опытные-промышленные испытания препарата для защиты растений (Бактериальная культура подвергалась облучению стимулирующей частотой)

Для подтверждения положительного влияния ЭМИ КВЧ на культуру *Bacillus subtilis* проводили опытно-промышленные испытания модифицированного препарата для защиты растений «Фитоспорин-2» на базе совхоза «Декоративные культуры» и НПО «Хасилат». Модификация состояла в облучении посевного материала бактериальной культуры ЭМИ с частотой 53,77 ГГц. Затем облученная культура использовалась для выпуска опытно-промышленной партии препарата. Семена зерновых обрабатывались раствором модифицированного препарата за два дня до посева. Контрольные семена обрабатывались раствором стандартного препарата.

Результаты испытаний показали, что при использовании модифицированного препарата происходит снижение пораженности болезнями мучнистой росой и бурой листовой ржавчиной всходов яровой пшеницы (таблица 3).

Кроме того, препарат испытывался на растениях огурцов, гвоздик и каллов. Выявлено, что модифицированный препарат обладает высокой антагонистической активностью по отношению к возбудителям корневых гнилей и фитофтороза. Применение модифицированного препарата повышает иммунитет растений, увеличивает урожайность овощных культур.

Таблица 3

Пораженность яровой пшеницы сорта «Лада» листовыми формами болезней после обработки препаратом «Фитоспорин-2»

Варианты опытов	Пораженность болезнями					
	Мучнистой росой				Бурой листовой ржавчиной	
	Фаза кушения		Начало цветения		Фаза начала налива зерна	
	%	Характеристика	%	Характеристика	%	Характеристика
Контроль – увлажнение водой, 10 л/т	28,0	Средняя	16,0	Слабая	5,0	Очень слабая
Фитоспорин, 1 л/т семян	24,0	Средняя	13,0	Слабая	5,0	Очень слабая
Фитоспорин-2, 1 л/т семян	21,6	Слабая	12,2	Слабая	4,5	Очень слабая

2. Опытнo-промышленные испытания препарата для защиты растений (При культивировании бактериальной культуры в среду вводился комплексон в стимулирующей концентрации).

Изменение процессов жизнедеятельности бактерий *Bacillus subtilis* и увеличение их биологической активности при введении в среду комплексона в стимулирующей концентрации подтверждается проведенными полевыми испытаниями. Испытывался модифицированный препарат для защиты растений «Фитоспорин-1», в состав которого входили бактерии, выращенные в присутствии комплексона.

Испытания проводили на семенах яровой пшеницы сортов «Лада», «Люба». Изучалось влияние исследуемого препарата и способа его внесения на посевные качества семян, а также на пораженность корневыми гнилями, мучнистой росой, бурой листовой ржавчиной в условиях стационарного и мелкоделучного опытов в вегетационный период на базе НПО «Хасилат».

Результаты показали, что модифицированный препарат обладает большей фунгицидной активностью по сравнению с препаратом, изготовленным по стандартному технологическому регламенту (таблица 4).

Кроме того, при обработке семян модифицированным препаратом улучшаются их посевные качества.

Таблица 4

Результаты анализа структуры урожаев в опыте с изучением эффективности биологического средства «Фитоспорин-1»

Варианты опыта	Количество растений на 1 м ² , шт.	Число зерен с одного колоса, шт.	Вес зерна с одного колоса, г	Абсолютный вес 1000 зерен, г	Вес зерна с 1 м ² , г
Контроль – увлажнение водой, 10 л/т	277	22	0,58	25,17	42,3
Фитоспорин, 1 л/т	280	22	0,53	25,2	43,5
Фитоспорин-1, 1 л/т	301,3	22	0,54	25,37	44,9

3. Выпуск опытной партии хлебопекарных дрожжей.

Для исследования стимулирующего действия ЭМИ на дрожжевую культуру в промышленных условиях был проведен выпуск опытных партий дрожжей на ОАО «Буинский сахарный завод». Все параметры технологического процесса, сырье и оборудование, использованные для производства опытной и контрольной партий дрожжей были идентичными.

Первая партия была выпущена в соответствии с технологическим регламентом. В конце культивирования получено 113,5 кг товарных дрожжей.

Для выпуска второй партии технологический регламент был несколько изменен. Дрожжевая культура, полученная после пересева с музейной, была подвергнута действию ЭМИ с частотой 54,17 ГГц. В дальнейшем разведение дрожжей проводили по традиционной схеме.

Во второй партии получено 139,5 кг товарных дрожжей. Выход дрожжей увеличился по сравнению с контрольной партией на 26 кг биомассы, что соответствует 23%.

По окончании процесса ферментации были проведены анализы технологических характеристик обеих партий дрожжей. Результаты показали, что эти характеристики соответствуют требованиям ГОСТа 171-81.

По результатам проведенного расчета технико-экономических показателей производства можно сделать выводы:

- годовой выпуск продукции увеличивается на 23%;
- увеличивается производительность труда при сохранении численности работающих;
- снижение себестоимости продукта составляет 3,75%;
- рентабельность продукции возрастает на 6,4%;
- годовой экономический эффект составляет 1753160 руб.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность стимуляции роста бактерий *Bacillus subtilis* 26D и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 509 путем введения комплексона ОЭДФ, как на стадии приготовления питательных сред, так и непосредственно перед началом процесса культивирования. Определены концентрации комплексона, позволяющие достичь максимального прироста биомассы – 29% для бактерий и 18% для дрожжей, при сохранении технологических показателей качества.
2. При воздействии ЭМИ миллиметрового диапазона на микробные культуры обнаружен острорезонансный характер зависимости изменения концентрации биомассы от частоты облучения для обеих микробных культур в исследованных диапазонах частот 53,5-54,5 ГГц и 61,0-63,0 ГГц.
3. Впервые показано, что при воздействии ЭМИ КВЧ с частотами 53,77 ГГц и 63,0 ГГц наблюдается максимальный прирост биомассы для бактерий *Bacillus subtilis* 26D по 30% для обеих частот. При этом значительно улучшаются физиолого-технологические показатели.
4. Установлено, что наибольший прирост биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 509 удается достичь при воздействии ЭМИ с частотами 54,17 ГГц и 61,8 ГГц (соответственно 36% и 28%), при этом улучшаются технологические показатели.
5. Структурно-динамический анализ импульсным методом ЯМР-релаксометрии биополимеров дрожжевых клеток, подвергнутых воздействию ЭМИ КВЧ и комплексона ОЭДФ, показал, что ЭМИ КВЧ воздействует на все структурные компоненты клетки в целом. Комплексон ОЭДФ в зависимости от концентрации способен влиять на метаболические процессы в отдельных клеточных структурах (клеточные оболочки и протоплазма).
6. Нарботаны опытные партии бактериальных препаратов, полученных как с использованием стимулирующей частоты 53,77 ГГц («Фитоспорин-2»), так и оптимальной концентрации комплексона 2 г/л («Фитоспорин-1»). Показана эффективность полученных препаратов в отношении увеличения всхожести семян злаковых культур и снижения пораженности семян и вегетирующих растений корневыми гнилями.
7. Выпущена опытно-промышленная партия хлебопекарных дрожжей по технологии, включающей использование облученного оптимальной частотой 54,17 ГГц посевного материала. Выход товарных дрожжей увеличился на 23%, при соответствии технологических характеристик готового продукта требованиям ГОСТа.

Основное содержание диссертации изложено в работах:

1. Крыницкая А.Ю. Влияние когерентного КВЧ-излучения нетепловой интенсивности на рост *Bacillus subtilis*/ А.Ю. Крыницкая, М.Н. Астраханцева, В.С. Гамаюрова, А.П. Монахов, Ю.В. Глазырина // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2001. – №2. – С.49-53.

2. Гамаюрова В.С. Стимуляция роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* действием комплексона ОЭДФ/ В.С. Гамаюрова, А.Ю. Крыницкая, М.Н. Астраханцева // Труды объединенной международной научной конференции «Новая геометрия природы». – Казань, 25 августа – 5 сентября 2003 года. – С. 72-75.
3. Крыницкая А.Ю. Особенности индивидуального и совместного действия комплексона ОЭДФ и КВЧ излучения на рост хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / А.Ю. Крыницкая, М.Н. Астраханцева, П.П. Суханов, В.С. Гамаюрова // Вестник Казанского Технологического Университета. – 2004. – №1-2. – С.138-146.
4. Гамаюрова В.С. Влияние ЭМИ КВЧ нетепловой интенсивности на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / В.С. Гамаюрова, А.Ю. Крыницкая, М.Н. Астраханцева // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2004. – №1-2. – С.117-120.
5. Крыницкая А.Ю. Влияние последствий КВЧ-излучения на активности хлебопекарных дрожжей / А.Ю. Крыницкая, П.П. Суханов, Ю.Е. Седельников, М.Н. Астраханцева, В.С. Гамаюрова // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2004. – №4 (36). – С.17-27.
6. Астраханцева М.Н. Особенности роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* под действием комплексона ОЭДФ и КВЧ-излучений / М.Н. Астраханцева, А.Ю. Крыницкая, В.С. Гамаюрова, П.П. Суханов // «Высокоэффективные пищевые технологии, методы и средства для их реализации». Сб. док. Всеросс. Научно-технической конференции-выставки. Ч.1 – Москва, 2004. – С.291-295.
7. Астраханцева М.Н. Влияние комплексона гидрооксиглицидиендифосфоновой кислоты на изменение состава питательной среды и рост бактерий *Bacillus subtilis* / М.Н. Астраханцева, А.Ю. Крыницкая, В.С. Гамаюрова // Вестник Казанского Технологического Университета. – 2005. – №1. – С.200-208.
8. Крыницкая А.Ю. Совершенствование технологии получения биологически-активного препарата защиты растений / А.Ю. Крыницкая, М.Н. Астраханцева, Ю.В. Глазырина, В.С. Гамаюрова // Материалы четвертой республиканской научной конференции «Актуальные экологические проблемы Республики Татарстан». – Казань «Новое знание», 14-15 декабря 2000 года. – С. 167-168.
9. Астраханцева М.Н. Использование физического воздействия в качестве стимулятора биологической активности препарата для защиты растений/ М.Н. Астраханцева, Ю.В. Глазырина, А.Ю. Крыницкая, В.С. Гамаюрова // Материалы конференции «Экологические проблемы города Казани» - Казань, 2001.- С.13.
10. Астраханцева М.Н. Воздействие ЭМИ КВЧ как фактор стимуляции микробного метаболизма/ М.Н. Астраханцева, Ю.В. Глазырина, А.Ю. Крыницкая, В.С. Гамаюрова // I форум молодых ученых и специалистов РТ. – Казань, 11-12 декабря 2001 года. – С. 95.
11. Крыницкая А.Ю. Пути совершенствования технологии производства биопрепарата для защиты растений от болезней/ А.Ю. Крыницкая, В.С. Гамаюрова, Ф.М. Мясликеев, М.Н. Астраханцева, Ю.В. Глазырина // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы развития прикладных

исследований и пути повышения их эффективности в сельскохозяйственном производстве». – Казань, 10-12 июля 2001 года. – С. 357-359.

12. Астраханцева М.Н. Использование комплексона ОЭДФ для стимуляции роста бактерий *Bacillus subtilis* и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*/ М.Н. Астраханцева, А.Ю. Крыницкая, В.С. Гамаюрова // «XVI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии». Тезисы докладов. – Казань, 21-26 сентября 2003 года. – С. 198.
13. Астраханцева М.Н. Стимуляция роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и бактерий *Bacillus subtilis* действием комплексона ОЭДФ/ М.Н. Астраханцева, А.Ю. Крыницкая, В.С. Гамаюрова // Материалы II Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 10-14 ноября 2003 года. – С.302.
14. Астраханцева М.Н. Стимуляция роста микробных культур действием ЭМИ КВЧ / М.Н. Астраханцева, А.Ю. Крыницкая, В.С. Гамаюрова // Тезисы докладов общероссийской конференции молодых ученых «Пищевые технологии». – Казань, 14 апреля 2005 года. – С.112.
15. Крыницкая А.Ю. Способ воздействия на рост и физиологическую активность хлебопекарных дрожжей / А.Ю. Крыницкая, М.Н. Астраханцева, В.С. Гамаюрова // Известия ВУЗов. Пищевая технология. - 2006. - №1. - С.15-16.

Сопискатель



М.Н. Астраханцева

Офсетная лаборатория Казанского государственного
технологического университета

Заказ 465

Тираж 80 экз.

