

## БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ЗАЩИТНО-СТИМУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Пашкова Е.В., Скорбина Е.А., Безгина Ю.А., Волосова Е.В., Шипуля А.Н.

*ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», г. Ставрополь, Россия (355017, г. Ставрополь, пер. Зоотехнический, 12), E-mail: [juliya.bezgina@mail.ru](mailto:juliya.bezgina@mail.ru)*

Разработаны технологии получения новых защитно-стимулирующих препаратов на основе молочной сыворотки и экстрактов лекарственных растений, а также на основе грибных меланинов и пиразолинов. Технологическая схема получения защитно-стимулирующего препарата из молочной сыворотки и экстракта корня солодки включает 7 блоков: приемка сырья, оценка качества; отделение жира и казеиновой пыли; получение растительных экстрактов; ферментация растительных экстрактов молочной сывороткой; стерилизация; розлив и упаковка; хранение и реализация. Технологическая схема получения защитно-стимулирующего препарата из меланина и пиразолина включает 14 блоков: 1–3 подготовка микробиологического мицелия для последующего выделения меланина; 4–8 – получение меланина путем ультразвуковой обработки мицелия, щелочной экстракции с последующим осаждением пигмента соляной кислотой и растворением в щелочной среде; 9–10 – приготовление второго компонента препарата за счет химического синтеза, включающего в себя реакции диазотирования п-сульфоанилина, азосочетания и реакцию образования производного пиразола, с дальнейшим разведением полученного соединения водой; 11 – смешивание компонентов в оптимальном соотношении; 12–14 стерилизация, розлив и упаковка, хранение и реализация. Проведены исследования качественных и количественных показателей препаратов, с целью стандартизации препаратов исследованы их фотометрические показатели. Проведены лабораторные исследования влияния защитно-стимулирующих препаратов на ростостимулирующую активность семян озимой пшеницы сорта ДОН – 95. Проведены полевые исследования по применению комплексных препаратов в технологии возделывания озимой пшеницы сорта Дон – 95, на опытных делянках учебно-опытного хозяйства СтГАУ. Разработаны практические рекомендации.

Ключевые слова: молочная сыворотка, солодка голая, меланин, пиразолин, озимая пшеница.

## BIOTECHNOLOGY PRODUCTION AND USE PROTECTIVE-STIMULATING DRUGS IN CROP

Pashkova E. V., Skorbina E. A., Bezgina J. A., Volosova E. V., Shipulya A. N.

*FSBEI HPE «Stavropol State Agrarian University», Stavropol, Russia (355017, h.12, cross-street Zootechnichesky, town Stavropol), E-mail: [juliya.bezgina@mail.ru](mailto:juliya.bezgina@mail.ru)*

The technologies of the new protective- stimulating drugs based on whey and herbal extracts, as well as on the basis of fungal melanin and pyrazolines. Technological scheme of obtaining protective stimulant whey extract and licorice root, includes 7 blocks: acceptance of raw materials, quality assurance, separation of fat and casein dust, obtaining plant extracts, fermentation plant extracts whey; sterilization, filling and packaging, storage and marketing. Technological scheme of obtaining protective stimulant of melanin and pyrazoline includes 14 units: 1–3 microbiological preparation for subsequent isolation of mycelial melanin; 4–8 – getting melanin by sonication mycelial alkaline extraction followed by precipitation with hydrochloric acid and pigment dissolving in alkaline medium, 9–10 – preparation of the second component of the drug by chemical synthesis, comprising the reaction of p-sulfoaniline diazotization, azo coupling reaction and the formation of a pyrazole derivative, a compound prepared by further dilution with water, 11 – mixing the components in the optimal ratio; 12–14 sterilization bottling and packaging, storage and marketing. Investigations of quantitative and qualitative indicators of drugs with the aim of standardizing drugs studied their photometric values. The laboratory studies of the effect of protective - stimulating drugs on growth promoting activity of wheat seeds varieties DON-95. Conducted field research on the application of complex products in the technology of cultivation of winter wheat varieties DON-95, on experimental plots teaching experimental farm SSAU. Develop practical recommendations.

Keywords: whey, liquorice, melanin, pyrazoline, winter wheat.

В настоящее время во многих странах мира, в том числе и в России, вопросы здорового питания населения возведены в ранг государственной политики. В связи с этим

ставится задача получения экологически безопасной сельскохозяйственной продукции и создания эффективных технологий ее переработки [1, 7].

В области сельскохозяйственного производства зерна высокого качества актуальным представляется поиск новых сырьевых ресурсов и разработка на их основе защитно-стимулирующих препаратов полифункционального действия, обеспечивающих повышение эффективности сельскохозяйственных технологий, получение экологически чистой сельскохозяйственной продукции и оказывающих положительное воздействие на экосистемы [2, 3].

При создании технологий регуляторов роста растений важен поиск рациональных по экономическим показателям разнообразных сырьевых ресурсов, содержащих комплекс биологически активных веществ.

Одним из таких сырьевых ресурсов может являться молочная сыворотка. В ней присутствуют все основные классы органических соединений: жиры, белки, углеводы, витамины, макро- и микроэлементы [4]. Молочная сыворотка, как показали проведенные нами ранее исследования, способна усиливать ростовые процессы в растениях, кроме того, является источником ферментов и активаторов ферментов и может способствовать значительному повышению активности некоторых ферментативных препаратов [5].

Другим сырьевым ресурсом могут быть меланины растительного и грибного происхождения, проявляющие высокую биологическую активность, отличающиеся широким разнообразием по химическому составу, физиологическим свойствам [1, 7].

Цель данной работы заключалась в разработке технологий получения новых защитно-стимулирующих препаратов на основе молочной сыворотки и экстрактов лекарственных растений, а также на основе грибных меланинов и пиразолинов, изучении их биологической активности и проведении исследований по их применению в растениеводстве.

Исследования проводились в НОЦ «БиотехХимВектор» ФГБОУ ВПО СтГАУ.

Технологические системы получения защитно-стимулирующих препаратов полифункционального действия представляют собой совокупность физико-химических процессов и их аппаратное оформление, обеспечивающее заданное качество готового продукта. При разработке технологических схем препаратов предусмотрено: комплексное использование сырья, получение безопасного и высококачественного препарата, повышенная экономическая эффективность, сохранение экологической чистоты окружающей среды.

При составлении технологических схем учитывались результаты экспериментально-лабораторных исследований, полупромышленных испытаний и рекомендации специалистов: технологов и агрономов. Полученные схемы максимально приближены к

условиям реального производства и представлены в виде блоков, включающих алгоритм последовательности выполнения технологических операций.

Технологическая схема получения защитно-стимулирующего препарата из молочной сыворотки и экстракта корня солодки включает 7 блоков.

### **Блок 1. Приемка сырья, оценка качества, сортировка**

Молочным сырьем при производстве препаратов служит творожная сыворотка. Кроме молочной сыворотки при получении препаратов используется электрохимически активированная вода, экстракты лекарственных растений. Активирование питьевой водой проводят на установке электрохимическим способом с использованием разработанной лабораторной установки, или специальных установок для ЭХА воды (Изумруд, Стел).

### **Блок 2. Отделение жира и казеиновой пыли**

Сепарирование сыворотки с содержанием жира более 0,1 % и наличием казеиновой пыли рекомендуется проводить на сепараторах марки AI-OXC или AI –OX2 –С при температуре  $(38\pm 2)$  °С. Приток сыворотки на сепаратор регулируют таким образом, чтобы жирность ее после сепарирования не превышала 0,1 %.

### **Блок 3. Получение растительных экстрактов**

Измельчение растительного сырья осуществляют на лабораторной мельнице в течение 30 мин. до размера частиц 0,4–0,5 мм. Для экстрагирования биологически активных веществ из растительных объектов растительное сырье в соотношении 1:10 твердая и жидкая фаза заливают щелочной фракцией электрохимически активированной воды при комнатной температуре, время экстрагирования составляет не менее 12 часов в темноте при комнатной температуре 22 °С. Экстракт, содержащий мелкодисперсный осадок, центрифугируют при 5000 об/мин. в течение 30 минут при комнатной температуре.

### **Блок 4. Ферментация растительных экстрактов молочной сывороткой**

Ферментацию растительных экстрактов молочной сывороткой проводят при оптимальных параметрах. Для получения препарата из экстракта солодки голый смешивают компоненты в соотношении экстракт: молочная сыворотка 1:3, проводят ферментацию в течение 30 минут при температуре 35 °С.

### **Блок 5. Стерилизация**

Стерилизацию препарата проводят на установки «УСФ–293», в режимах ее эксплуатации, что обеспечивает прозрачность препаратов, отсутствие осадка и взвеси.

### **Блок 6. Розлив и упаковка**

Производят розлив препаратов во флаконах объемом 500 мл, которые укупоривают резиновыми пробками с металлическим колпачком. Флаконы упаковывают по 10 шт в картонные упаковки по ГОСТ 1230–01 с разделительными прокладками.

### **Блок 7. Хранение и реализация**

Хранение препаратов осуществляют в холодильных камерах с температурой 4–8 °С. Сроки реализации от 1 месяца до 1 года.

Технологическая схема получения защитно-стимулирующего препарата из меланина и пиразолина включает 14 блоков.

### **Блок 1. Отбор почвы, очистка от примесей**

Сырьем для выращивания мицелия грибов является почва. Почву очищают от инородных примесей и проводят диспергирование почвенных агрегатов. Этот процесс осуществляется механическим воздействием с использованием ступки и пестика.

### **Блок 2. Микробиологический посев из почвы**

После предварительного диспергирования почвы готовят разведения почвенной суспензии. Навеску 10 г почвы смешивают с нестерильной дистиллированной водой в соотношении 1:100. Затем проводят 3-4 последовательных разведения 1:10. В чашки Петри наливают разогретую среду Чапека (по 20-30 мл среды). Проводят посев по 1 мл разведенной почвенной суспензии в чашку, засеянные чашки переворачивают вверх дном и помещают в термостат (температура 28°C) на 7 суток.

### **Блок 3. Выделение грибов в чистую культуру**

Чашки с микробиологическим посевом достают из термостата на 7-й день роста колоний. Далее проводится диагностика микроскопических грибов. Основываясь на культуральных и морфологических признаках, определяют колонии грибов рода *Penicillium*. Определенную грибную культуру высевают на жидкую питательную среду, содержащую 0,2 г  $K_2HPO_4$ ; 0,2 г  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 г  $KCl$ ; 2,0 г  $NH_4NO_3$  и 30 г глюкозы на 1 л воды (Звягинцев и др., 1980). Среду стерилизуют в автоклаве при давлении 0,5 атмосфер в течение 30 минут. Посев производят нанесением небольшого количества посевного материала (спор или мицелия) специальной иглой на питательную среду.

Мицелий наращивают при 26 °С в колбах в течение двух недель. После этого мицелий извлекают из колб, промывают дистиллированной водой для удаления культуральной жидкости и высушивают до воздушно-сухого состояния при температуре 40 °С. Выход сухого мицелия составляет 7–10 г на 1 л питательной среды.

Таким образом, производится первый сырьевой компонент комплексного препарата, представляющий собой сухую массу мицелия гриба рода *Penicillium*.

### **Блок 4. Обработка мицелия гриба ультразвуком**

Полученную массу мицелия гриба измельчают и обрабатывают ультразвуком на приборе УЗДН – 2Т при рН 5,5. Сухой мицелий заливают 20 мл дистиллированной воды, проводят обработку в диапазоне 44 кГц (время воздействия 30 минут). После обработки биомассу гриба отфильтровывают и высушивают.

#### **Блок 5. Блок 6. Экстракция мицелия гриба 0,1 Н NaOH. Обработка экстракта концентрированной HCl**

Сухой мицелий заливают 0,1Н NaOH в соотношении мицелий: щелочь 1: 25; через сутки экстракт отфильтровывают и мицелий снова заливают щелочью. Процедуру экстракции повторяют 3–4 раза, экстракты объединяют и из полученного раствора осаждают меланин, подкислением HCl до рН 2. Осадок меланина отделяют центрифугированием 10 минут при 5000 оборотов в минуту.

#### **Блок 7. Промывка меланина водой и растворителями**

Для очистки от низкомолекулярных примесей меланин несколько раз переосаждают, осадки промывают дистиллированной водой до рН надосадочной жидкости 6–7 и дополнительно промывают этанолом и ацетоном. Меланины высушивают при температуре 40 ° и растирают до состояния мелкодисперсного порошка. Содержание полученного таким образом меланина в мицелии гриба *Penicillium* sp. в пересчете на абсолютно сухое вещество составляет 10,2 %.

#### **Блок 8. Экстракция мицелия гриба**

Сухой, измельченный меланин растворяют в 0,1 Н NaOH в концентрации 0,1 %. Путем нейтрализации раствора кислотой рН доводят до значения 8,1.

#### **Блок 9. Синтез производного пиразола**

Для получения производного пиразола к 1 г п-сульфоанилина приливали в колбу 60 мл 1Н HCl и далее 0,6г NaNO<sub>2</sub> и проводили реакцию диазотирования в течение 30 минут. К образующейся соли диазония добавляли 1Н NaOH, доводили значение рН до 7,0. В последующем для осуществления реакции азосочетания к соли диазония прибавляли 1,5 г альдегида ацетоуксусной кислоты, предварительно растворив его в ледяной уксусной кислоте. Реакция осуществлена при температуре 20–22 °С в течение 20 минут. На заключительной стадии к промежуточному продукту синтеза приливали 1,2 г фенилгидразина, который был растворен в 15 мл этанола, реакция проводилась при 40 °С в течение 1,5 часов. Осуществляли перекристаллизацию производного пиразола, выход целевого продукта составил 92 %.

#### **Блок 10. Разведение препарата на основе пиразолина водой**

Второй сырьевой компонент (С-2), сухой порошок пиразолина (4-(5-гидрокси-3-метил-1-фенил-4,5-дигидро-1Н-пиразол-4-илазо) бензолсульфо- кислота) растворяют в воде до концентрации 0,12 %.

#### **Блок 11. Смешивание компонентов комплексного препарата**

Щелочной раствор меланина смешивают с препаратом на основе пиразолина (4-(5-гидрокси-3-метил-1-фенил-4,5-дигидро-1Н-пиразол-4-илазо) бензолсульфо-кислота) в оптимальном соотношении 1:1.

#### **Блок 12,13. Стерилизация. Розлив и упаковка**

Технологический процесс осуществляется аналогично описанию блоков 5–6 технологической схемы получения препарата из молочной сыворотки.

#### **Блок 14. Хранение и реализация**

Хранение комплексного препарата не требует специальных режимов. Температура хранения от 5 до 25 °С. Срок реализации препарата до 3-х лет.

Проведены исследования качественных и количественных показателей препаратов, методами УФ- и ИК-спектроскопии. С целью стандартизации препаратов исследованы их фотометрические показатели на фотоэлектроколориметре «ФЭК-56М» на разных светофильтрах в диапазоне длины волны 400–630 нм. Качественные и количественные показатели защитно-стимулирующих препаратов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Качественные и количественные показатели защитно-стимулирующих препаратов

Наименование Показателей	Препарат на основе молочной сыворотки	Препарат на основе меланина
Цвет	Темно – бежевый	Коричневый
Прозрачность	Прозрачный	Прозрачный
рН	6,2	8,1
Оптическая активность $D_{400/440}$ нм	0,89	0,82
Ростостимулирующая активность, %	95-98	96 – 98
Стерильность	Стерильный	Стерильный

Дальнейшая задача исследований состояла в изучение влияния защитно-стимулирующих препаратов на ростостимулирующую активность семян растений. В качестве объекта исследований по изучению влияния данных препаратов были выбраны семена озимой пшеницы сорта ДОН-95. Ростостимулирующая активность и посевные качества семян определяли по традиционным методам и ГОСТу 10968-6-88.

Исследования по влиянию препаратов на энергию прорастания, лабораторную всхожесть, изменение длины проростка, корешка и их биомассы, представлены в таблице 1 и свидетельствуют об эффективности биостимулирующих свойств данных препаратов.

Таблица 1. Ростостимулирующая активность комплексных препаратов при действии на семена озимой пшеницы сорта Дон-95

Вариант	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина, см		Масса, г	
			корешка	Ростка	корешка	Ростка
Контроль	95	95	8,8±0,46	7,9±0,39	2,4±0,12	4,1±0,20
Гиббереллин (эталон)	98	98	9,4±0,47	8,9±0,44	2,9±0,14	4,7±0,23
Комплексный препарат (молочная сыворотка+экстракт солодки голой)	98	99	9,6±0,48	9,4±0,44	3,6±0,15	5,0±0,23
Комплексный препарат (меланин + пиразолин)	98	100	9,9±0,49	9,8±0,49	3,7±0,18	5,2±0,26

Проведены исследования по применению комплексных препаратов в технологии возделывания озимой пшеницы сорта Дон-95, на опытных делянках учебно-опытного хозяйства СтГАУ.

Данные, представленные в таблице 2, показывают, что оба исследуемых препарата позволяют увеличить практически все показатели структуры урожая и получить прибавку биологического урожая на 5,7-8,3 ц/га (таблица 2).

Таблица 2. Влияние комплексных препаратов на качественные показатели и урожайность зерна озимой пшеницы сорта Дон-95

Варианты	Стекловидность, %	Натура зерна, г/л	Количество клейковины, ИДК	Количество клейковины, %	Урожайность ц/га
Контроль (без обработки)	43,1	743	50,3	27,2	40,1
Эталон – Премис	48,8	782	57,9	28,1	44,8
Комплексный препарат (молочная сыворотка+экстракт солодки голой)	49,2	798	64,5	28,9	45,8
Комплексный препарат (меланин + пиразолин)	50,1	801	65,0	29,2	48,4

В качестве практических рекомендаций в технологии возделывания озимой пшеницы сорта Дон-95 рекомендуем предпосевную обработку комплексными препаратами, с нормой расхода 2 л/т.

### Список литературы

1. Биотехнологические аспекты получения комплексного препарата с ростостимулирующей и фунгицидной активностью на основе ферментации растительного сырья молочной

сывороткой / Е.В. Дергунова, А.Н. Шипуля, Л.В. Мазницына, Е.С. Романенко // Научная жизнь. – 2010. – № 1. – С. 14-19.

2. Биотехнология получения и исследование свойств новых сорбционных материалов и стимуляторов роста растений // Е.С. Романенко, Е.В. Пашкова, А.Н. Шипуля, Ю.А. Безгина, Л.В. Мазницына, М.В. Добронравова, Е.А. Скорбина, О.В. Шарипова. – Ставрополь, 2013.

3. Разработка методов культивирования тканей маклеи сердцевидной / Л.В. Мазницына, А.Н. Шипуля, Е.В. Дергунова, А.А. Беловолова // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2009. – Т. 1. – № 17. – С. 162-167.

4. Разработка технологии получения из молочной сыворотки регуляторов роста растений с использованием электроактивированной воды, процессов сорбции и ферментации / Е.В. Плющ: автореферат дисс. ... канд. техн. наук / Северо-Кавказский гос. техн. ун-т. – Ставрополь, 2005.

5. Разработка технологии получения из молочной сыворотки регуляторов роста растений с использованием электроактивированной воды, процессов сорбции и ферментации / Е.В. Плющ: дисс. ... канд. техн. наук / Ставропольский гос. аграрный ун-т. – Ставрополь, 2005.

6. Определение термодинамических характеристик иммобилизованных сорбентов / А.Н. Шипуля, Е.В. Пашкова, А.А. Беловолова // Сборник научных трудов Sworld. – 2013. – Т.48, № 3. – С. 91-94.

#### **Рецензенты:**

Ченикалова Е.В., д.б.н., профессор кафедры химии и защиты растений ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», г. Ставрополь.

Лысенко И.О., д.б.н., заведующая кафедрой экологии и ландшафтного строительства ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный аграрный университет», г. Ставрополь.