

**БЕЛКОВЫЙ КОНЦЕНТРАТ ИЗ БЕЛОГО ЛЮПИНА СОРТА ДЕГА
Д. Б. Просвирников, Д. В. Тунцев, М. К. Гайнуллина, Н. Р. Касанова**

Реферат. Цель данной работы заключается в получении растительного белкового концентрата для животноводства путем ферментативной обработки люпина и оценке его характеристик питательности в целях применения в животноводстве. В работе был использован люпин белый Дега (урожай 2019 года, Республика Татарстан). Семена люпина предварительно обрабатывали в экструдере для кормов ЭМ-150 (Россия) на производственной площадке предприятия ООО «НТЦ ГринТекс» (г. Казань). В семенах до и после экструзии определяли концентрацию общего азота, истинного белка, клетчатки, жира, золы, пектина, крахмала. Ферментативный гидролиз люпина проводили с ферментными препаратами Novozymes (Дания) и ООО ПО «Сиббиофарм» (Россия). Ферментативный гидролиз проводили в лабораторном шейкере-инкубаторе Kuhner ISF1-X (Швейцария) с последующим отделением твердой и жидкой фракции центрифугированием. Твердый осадок (белковый концентрат) сушили, определяли содержание общего и истинного азота. Большая часть жира из экструдированного люпина высвобождается в процессе ферментативного гидролиза в гидролизат. В случае с ферментами Novozymes максимум выхода редуцирующих веществ (РВ) (1,66%) наблюдается уже через 5-6 часов (без обработки экструзией - 10-12 часов (1,55%)); в случае с препаратами Сиббиофарм максимум РВ (2,2%) достигается через 1,5 часа после начала обработки. ИК-спектроскопия (Shimadzu, Япония) показала изменение в химической структуре как углеводов, так и белков. Удалось повысить концентрацию белка в итоговом продукте с 39,8% до 47,58%. Оценка аминокислотного состава на анализаторе NIRSTMDS 2500 показала, что ферментативная обработка семян люпина позволяет увеличить в них сумму аминокислот с 25,95 до 42,08%, в том числе заменимых аминокислот с 9,97 до 15,21%, незаменимых аминокислот с 15,98 до 26,87%. Полученный белковый концентрат из люпина может быть использован в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы с целью балансирования рационов по аминокислотам.

Ключевые слова: люпин, белковый концентрат, экструзия, ферментализ, аминокислоты, протеин, кормовой белок.

Введение. Развитие животноводства в России, как одной из приоритетных отраслей агропромышленного комплекса, ввиду реализации программ импортозамещения и постоянного роста цен на белковые компоненты кормов на ближайшую перспективу потребует существенного увеличения производства кормов, повышения их качества и совершенствования технологий кормопроизводства, применяя комплексные подходы к переработке альтернативного растительного сырья. Кроме общего дефицита кормов необходимо исключить и ставший хроническим дефицит в таких важнейших для питания сельскохозяйственных животных веществах, как протеин и белковые концентраты. Ежегодный общемировой дефицит кормового белка превышает 30 млн т, а в России он составляет около 2-2,5 млн т.

Тенденция в современном животноводстве заключается в увеличении потребления растительного и одноклеточного микробного белка вместо животного. Поэтому существует озабоченность по поиску новых источников альтернативного белка. В этом смысле бобовые являются основным источником белка растительного происхождения. Соя представляет безусловный практический интерес для компаний, занимающихся глубокой переработкой растительного сельскохозяйственного сырья. В результате ограничения диверсификации белковых кормовых продуктов зоотехники восполняют дефицит кормового белка именно за счёт сои, в большинстве случаев генномодифицированной. При этом цена на такие

продукты (соевый шрот, соя полножирная экструдированная) крайне высоки и составляют большую долю в стоимости готовых кормов.

Альтернативой сое успешно рассматривается люпин белый (*Lupinus albus*) [1]. Из всех бобовых люпин имеет более высокое содержание белка, хотя в настоящее время он недооценен как альтернатива для потребления в кормах в силу наличия антипитательных веществ, которые легко могут быть извлечены с помощью биотехнологии. Богатый аминокислотный состав позволяет рассматривать эту культуру в качестве альтернативе сои. При этом культура неприхотлива к выращиванию в средних широтах страны. Несмотря на перспективы использования люпина в вопросе дефицита кормового белка, комплексных решений по глубокой переработке люпина в целях повышения питательности данной культуры в кормах все еще нет.

Люпин — очень питательная бобовая культура с высоким содержанием белка и клетчатки, но он также содержит хинолизидиновые алкалоиды, которые в зависимости от вида могут накапливаться до токсичных уровней. Удаление таких антипитательных веществ достигается обработкой водой, экструдированием [2, 3]. Кроме того, экструзия способствует повышению усвояемости белка и защищает протеин от разложения в рубце [4].

Применение методов предварительной термообработки люпина сегодня может использоваться не только с целью удаления

антипитательных веществ, поскольку современные программы селекции уже обеспечили отбор сладких видов люпина с пониженным содержанием алкалоидов ($\leq 0,2$ г/кг СВ) [5]. Такие обработки необходимы для биотехнологических процессов, так как позволяют существенно раскрыть удельную поверхность семян, что во много раз ускоряет гидролитические реакции, обработку ферментами.

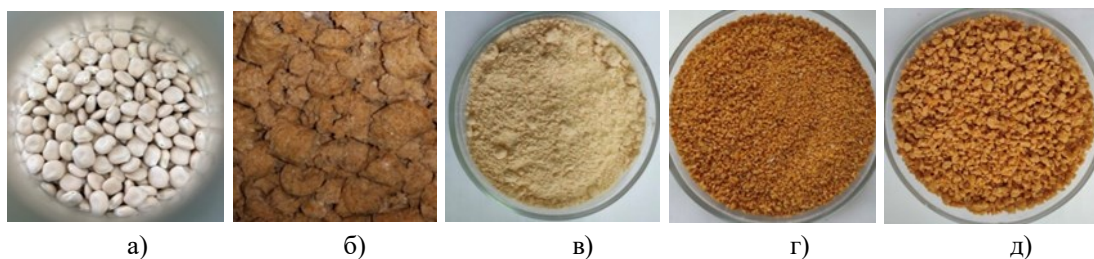
Для производства изолятов, концентратов и гидролизатов белка люпина используются многочисленные методы [6]. И практически во всех этих методах наибольшую эффективность показывают именно культуры, прошедшие какую-либо предварительную обработку. Как правило, это термозэкструзия и водная варка. Ферментативный гидролиз не является исключением. Здесь экструдирование способствует увеличению растворимых углеводов в семенной оболочке люпина [7], обеспечивая ферментам более полный доступ к трудногидролизуемым фракциям углеводов [8].

Подбор ферментных композиций [9], учитывая углеводный состав люпина, с целью получения белковых концентратов путем избирательного ферментативного гидролиза, является наименее изученным. В литературе большая часть работ посвящена гидролизу белковой фракции семян люпина [10], в частности протеолитическими ферментами [11]. Целью таких обработок является получение белковых гидролизатов для пищевой промышленности [12]. Обеспеченность белком в пищевой промышленности напрямую связана общемировым дефицитом кормового белка, что является актуальной проблемой в животноводстве. Поэтому представляет большой интерес получения более дешевых белковых

концентратов из люпина именно для кормопроизводства. Учитывая тот факт, что практически все животноводство перешло на рационы с растительным белком, а также микробным – комплексная биотехнологическая переработка бобовых культур, в частности люпина, является крайне актуальной и первостепенной практической задачей производства кормового белка.

В связи с этим, цель данной работы заключается в получении растительного белкового концентрата для животноводства путем ферментативной обработки люпина и оценке его характеристик питательности в целях применения в животноводстве.

Условия, материалы и методы. В работе был использован люпин белый Дега, созданный в РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева и предоставленный ТатНИИСХ, ФИЦ Казанский научный центр РАН. Семена получены с урожая 2019 года. Содержание жира (по данным ТатНИИСХ) 8-10%, белка 37-38%, алкалоидность семян 0,05%. Семена люпина были измельчены на лабораторной мельнице «ВЬЮГА ЗМТ» (Россия) до мелкой (0,5-1 мм) фракции. Также была проведена дополнительная обработка: семена люпина были подвержены в неизмельченном виде экструдированию в одношнековом экструдере для кормов ЭМ-150 (Россия) на производственной площадке предприятия ООО «НТЦ ГринТекс» (г. Казань). Температура экструзии – 150°C, продолжительность обработки – 8-10 с. На рисунке 1 представлены образцы до и после экструзии и измельчения. Экструдированный люпин также измельчался в мельнице «ВЬЮГА ЗМТ» (Россия) на 3 фракции: мелкая (0,5-1 мм), средняя (1-2 мм) и крупная (2-5 мм).



а)

б)

в)

г)

д)

Рис. 1 - Образцы до и после экструзии и измельчения:

а) семена люпина,

б) семена люпина после экструзии,

в) мелкая фракция измельченного люпина,

г) средняя фракция измельченного экструдированного люпина,

д) крупная фракция измельченного экструдированного люпина

Влажность образцов измерялась на автоматическом анализаторе влажности AND MX-50 (Япония). Концентрацию белка (общего азота) в люпине определяли по методу Кьельдаля (в установке для мокрого озольнения от компании SELECTA, Испания, с выносным температурным блоком в вытяжном шкафу, с последующей отгонкой аммиака), истинного белка – по методу Барнштейна, клетчатки – по Геннебергу и Штоману, жира – по ГОСТ 13496.15-2016

в аппарате Сокслета, золы – по ГОСТ 26226-95, пектина – по ГОСТ 54066-2010, крахмала – по ГОСТ ISO 6493-2015.

Для проведения ферментативного гидролиза были использованы зарубежные ферментные препараты Novozymes (Дания), а их характеристика прописана в таблице 1. В работе использовали препараты, предназначенные только для гидролиза полисахаридов.

Таблица 1 - Характеристика препаратов Novozymes

Класс	Активность	Плотность,	pH	T, °C	Дозировка,
		г/мл			% w/w (TS)
NS22074	1,000 EGU/г	1,15	5,0-5,5	45-50	1-5
Целлюлазный комплекс					
NS50010	250 CBU/г	1,2	2,5-6,5	45-70	0,2-0,6
β-глюкозидаза					
NS22002	45 FBG/г (~470 FXU/г)	1,2	5,0-6,5	40-60	0,4-2,0
β-глюканаза					
Ксиланаза					
NS22035	750 AGU/г	1,15	4,5-5,5	60-70	0,01-0,06
Глюкоамилаза					

Исходя из данных по количественному содержанию в сырье крахмала, клетчатки, свободных сахаров определяли дозировки ферментных препаратов и составляли ферментную композицию по схеме (табл. 2).

Таблица 2 - Схема расчета ферментной композиции Novozymes (для исходного люпина без обработки)

Состав люпина	%, а.с.в	г/кг	Препарат	Доза мин, % г/г TS	Доза макс, % г/г TS	Расход мин, г	Расход макс, г
Влага	12	120	—	—	—	—	—
Белок	35	350	—	—	—	—	—
Целлюлоза	10	100	NS22074	1	5	1	5
Целлюлоза (конверсия целлобиозы)	10	100	NS50010	0.2	0.6	0.2	0.6
Жир	10	100	—	—	—	—	—
Зола	3	30	—	—	—	—	—
Пектин	10	100	NS22002	0.4	2	0.4	2
Крахмал	10	100	NS22035	0.01	0.06	0.01	0.06
ГМЦ, сахара	10	100	NS22002	0.4	2	0.4	2
Итого	100	1000					

Также сравнительный ферментативный гидролиз проводили с отечественными препаратами компании ООО ПО «Сиббиофарм» (табл. 3). В работе использовали препараты, предназначенные только для гидролиза полисахаридов.

Таблица 3 - Характеристики препаратов ООО ПО «Сиббиофарм»

Препарат	Краткая характеристика
Глюкаваморин ГЗх	Комплекс ферментных препаратов применяют для осахаривания частично переваренных полимерных молекул крахмала, глюкоамилазы последовательно гидролизуют α-1,4- и α-1,6-гликозидные связи, арсеппей с невосстановительными концами молекул крахмала, декстри-нов, олигосахаридов остатков глюкозы
Амилосубтилин	Состав препарата: α-амилаза, активность – не менее 1500 ед/г; β-глюканаза, активность – до 500 ед/г; ксиланаза, активность – до 100 ед/г. Комбинировано воздействует на сырье и тем самым катализирует расщепление трудноусвояемых полисахаридов, гидролиз дает дополнительное количество сахаров
ЦеллюЛюкс-А	Препарат, сбалансированный по ксиланазной, β-глюканазной и целлюлазной активностям. Ферментный комплекс обеспечивает поэтапное расщепление клетчатки, ксиланов и XX-глюканов в растительной клетке. Повышается доступность белка, крахмала и жира для воздействия пищеварительных ферментов

Исходя из данных по количественному содержанию в сырье крахмала, клетчатки, свободных сахаров определяли расход ферментных препаратов и составляли ферментную

композицию (табл. 4). Расход препарата (г/кг) определяли по формуле:

$$F = (P \cdot R \cdot 10) / A \quad (1)$$

Таблица 4 - Схема расчета ферментной композиции «Сиббиофарм» (для исходного люпина без обработки)

Состав люпина	P, % а.с.в	Препарат	Активность, А, ед/г	Норма, R, ед/г	Расход препарата F, г/кг
Влага	12	—	—	—	—
Белок	35	—	—	—	—
Целлюлоза, в т.ч. конверсия целлобиозы	10	ЦеллоЛюкс-А (Ц)	2000	30	1,5
Жир	10	—	—	—	—
Зола	3	—	—	—	—
Крахмал	10	Амилосубтилин (А)	1500	2	0,133
		Глюкаваморин ГЗх (Г)	3000	6,2	0,206
ГМЦ, сахара	10	ЦеллоЛюкс-А (Ц)	2000	30	1,5

Ферментативный гидролиз препаратами Novozymes проводили следующим образом. В стерилизованные колбы 1000 мл помещали подготовленное сырье (исходный люпин мелкой фракции, экструдированный люпин мелкой фракции, экструдированный люпин средней фракции, экструдированный люпин

крупной фракции), ферментную композицию и дистиллированную воду в расчетном количестве, колбы закрывали ватно-марлевым тампоном. Ферментативный гидролиз проводили в лабораторном шейкере-инкубаторе Kuhner ISF1-X (Швейцария) при $t=50-60^{\circ}\text{C}$, 100 мин^{-1} , $\text{pH}=5.5$, в течение 24 часов (рис. 2).



Рис. 2 – Ферментативный гидролиз в лабораторном шейкере

Каждые 2 часа из колб отбирали пробы гидролизата, центрифугировали на центрифуге Biobase (Китай) при 10000 мин^{-1} в течение 5 минут, и в надосадочной жидкости определяли pH (на анализаторе Мультитест ИПЛ – 311, Россия), концентрацию редуцирующих веществ (далее - РВ) в пересчете на глюкозу (метод Бенедикта Бертрана), сухой вес редуцирующих веществ (сушка проб в лабораторном шкафу ESCO Isotherm, Китай с последующим взвешиванием). Все измерения проводили в двух повторностях.

По окончании ферментативного гидролиза содержимое колб центрифугировали и отделяли надосадочную жидкость (4 образца) от твердого остатка, стерилизовали кипячением и готовили к дальнейшему культивированию. Твердый осадок (4 образца) сушили в шкафу при $103-105^{\circ}\text{C}$ в течение 12 часов, после чего измельчали. В полученных твердых образцах (рис. 3) было определено количественное содержание общего и истинного азота. По результатам ферментативного гидролиза была определена оптимальная фракция измельченного сырья.



Рис. 3 – Экструдированный люпин после ферментативного гидролиза и сушки, гидролизат (надосадочная жидкость)

Ферментативный гидролиз препаратами ООО ПО «Сиббиофарм» проводили следующим образом. В колбы 1000 мл добавляли 250 мл дистиллированной воды и 50 г сырья (исходный люпин мелкой фракции, экструдированный люпин мелкой фракции) и нагревали на электроплитке до кипения. Температуру держали на уровне 95-98°C, контролируя термометром, в течение 1,5 ч. Через 30 мин после кипения, брали первую пробу РВ с центрифугированием. Далее колбы охлаждали до 70-80 °С и извлечением второй пробы РВ, после чего добавляли А 0,01 г, перемешивали и контролировали рН, чтобы уровень находился в диапазоне 5-8. Выдерживали при заданных условиях 30 минут, брали третью пробу РВ. После выдержки вводили ферментную композицию, состоящую из А 0,01 г, Г 0,03 г, Ц 0,2 г. Контроль рН выдерживали на уровне выше 5,5. Далее колбы размещали в шейкере на 120 минут при 120 мин⁻¹. Через 30 мин отбирали четвертую пробу РВ с центрифугированием. По йодной реакции определяли наличие остаточного крахмала и брали пятую пробу РВ.

По отсутствию цветной реакции завершали процесс ферментативного гидролиза и отделяли твердый остаток от жидкости. Гидролизат стерилизовали кипячением и подготавливали к культивированию микробного белка. Результаты нашей работы по культивированию дрожжей *Candida guilliermondii* на углеводных гидролизатах люпина подробно представлены в [13]. Твердый остаток сушили в печи при 105 °С и анализировали на содержание сырого протеина и белка

по Барнштейну.

Также образцы порошков (исходный люпин, экструдированный люпин, ферментированный люпин (ферментами Novozymes) и проба после обработки по Барнштейну) были проанализированы на ИК-анализаторе на кафедре технологии синтетического каучука ФГБОУ ВО «КНИТУ».

Микрофотографии образцов были получены на конфокальном оптическом микроскопе Leica DCM 3D в режиме увеличения 20X и 50X в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Наноматериалы и нанотехнологии» ФГБОУ ВО «КНИТУ».

В лабораторных условиях проведены аналитические исследования аминокислотного состава белкового сырья на кафедре кормопроизводства ФГБОУ ВО «КГАВМ». Анализ образцов проводили на анализаторе NIRSTTMDS 2500, откалиброванном с использованием глобальных данных. Для управления использовано программное обеспечение ISIScan Nova. Объекты исследования:

- 1) экструдированные семена сои сорта «Миляуша» (образец 1-контроль);
- 2) экструдированные семена люпина сорта «Дега» (образец 2);
- 3) люпиновый белковый концентрат (образец 3).

Сорт сои «Миляуша» выведен совместно Сибирским и Татарским НИИСХ, люпин белый сорта «Дега» создан в РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева.

Результаты и обсуждение. В таблице 5 представлен компонентный состав люпина до и после обработок в % от абсолютно сухого вещества (далее - а.с.в).

Таблица 5 - Компонентный состав люпина до и после обработок, % а.с.в.

	Люпин исходный	Люпин экструдированный	Экструдированный люпин после фер- ментативного гидро- лиза (Novozymes)	Экструдированный люпин после фер- ментативного гидро- лиза (Сиббиофарм)
Влага	8,8	4,4	3,6	8,73
Общий N	39,8	40,2	47,6	45,4
Белок по Барнштейну	18,9	19	19,5	19,8
Клетчатка	10	9,3	4,2	6,2
Жир	12	11,5	3,5	2,4
Зола	3,2	3,2	3,1	3,0
Пектин	10,1	6,6	0,2	1,72
Крахмал	8,2	4,11	0,15	0,05

Как видно из таблицы 5, экструдирование способствует снижению количества пектина, крахмала и незначительно клетчатки. Повышенная температура обработки и содержащаяся влага в семенах позволяют ускорить реакции гидролитической деструкции углеводов, особенно легкогидролизуемых. Основным же достоинством экструдирования является раскрытие удельной поверхности семян люпина, в особенности их оболочки, состоящей главным образом из целлюлозы и гемицеллюлоз. Также важным фактором является высвобождение жира, содержание которого в семенах достигает 12%. Эти физико-химические преобразования способствуют интенсификации ферментативной обработки благодаря доступности субстрата проникновению ферментов. Экструдированный люпин после ферментативного гидролиза содержит пониженное количество полисахаридов и жира. Большая часть жира высвобождается в процессе ферментативного гидролиза в гидролизат.

Поскольку экструзионная обработка длится 8-10 с существенных изменений в морфологии на микроуровне не наблюдается (рис. 4), можно заметить лишь некоторые изменения

в цвете частиц люпина до и после термообработки, что может быть связано с термодеструкцией легкогидролизуемых полисахаридов, например гемицеллюлоз, у которых при повышенных температурах в присутствии воды отщепляются ацетильные группы, участвующие в образовании уксусной кислоты, которая в свою очередь способствует разрыву гликозидных связей. Образующиеся моно- и олигосахариды пентоз при высоких температурах могут распадаться до фурфурола, придавая среде коричневый «карамельный» цвет. Также изменению цвета может способствовать термодеструкция триглицеридов. На уровне размеров зерна изменения явные (см. рис. 1 а, б), поскольку раскрытие поверхности осуществляется благодаря сбросу давления при выходе из экструдера, а также механическим сдавливанием семян в шнеке экструдера.

Однако, как показывают данные компонентного анализа, изменения в составе люпина после термообработки есть, и эти изменения (в частности снижение доли крахмала, пектина) призваны в дальнейшем способствовать сокращению продолжительности и повышению эффективности процесса ферментативного гидролиза.

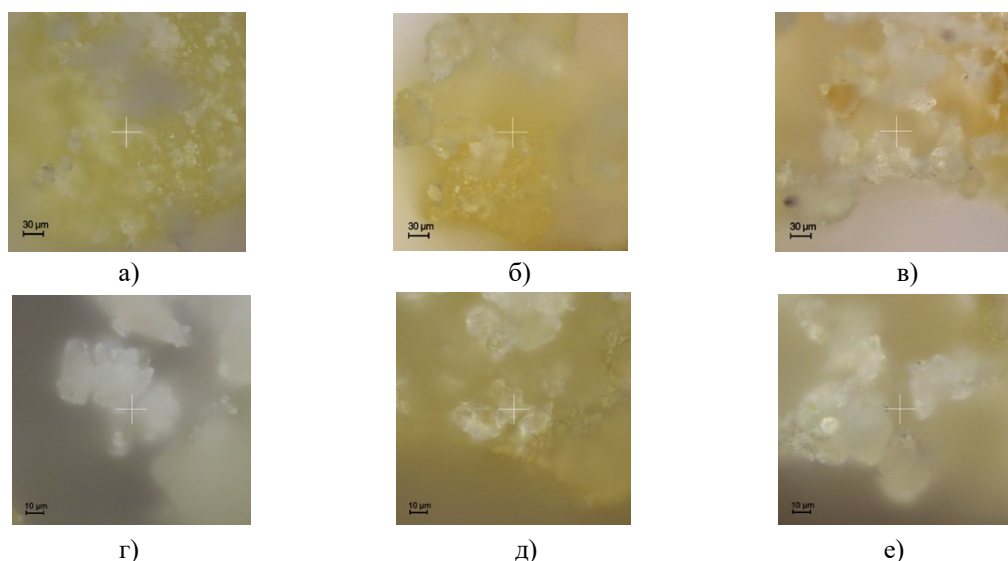


Рис. 4 – Микрофотографии поверхности частиц (слева-направо): исходный люпин, экструдированный люпин, люпин после ферментативного гидролиза (Novozymes): а) - в) – 20-кратное увеличение; г) – е) – 50-кратное увеличение

В нашей работе [14] подробно проанализированы ИК-спектры люпина исходного и экструдированного, которые подтверждает химические изменения в структуре белков, жиров и углеводов, происходящих при термообработке семян люпина.

На рисунке 5 представлены результаты изменения концентрации редуцирующих веществ (в пересчете на глюкозу) при ферментативном гидролизе с препаратами Novozymes.

Здесь видно, что экструдирование (особенно при использовании мелкой фракции) позволяет достичь максимума выхода РВ (1,66%) уже через 5-6 часов, в то время как необработанное экструзией сырье выходит на максимальное количество РВ через 10-12 часов (1,55%). Очевидно, здесь играет важную роль раскрытая поверхность семян люпина и предварительные химические преобразования полисахаридных компонентов в течение

термообработки. Максимумы выхода РВ для более крупных фракций экструдированного люпина близки к исходному сырью. Однако, скорости выхода РВ здесь объясняются по-разному. У исходного люпина мелкой фракции более низкая скорость обусловлена наличием большего количества углеводов, подвергаемых ферментативному гидролизу, и нераскрытой удельной поверхностью. У более крупных фракций экструдированного люпина скорость замедляется за счет размера частиц, но выходы РВ сопоставимы, с выходом из необработанного люпина. Так как максимумы РВ наблюдаются в среднем через 4-6 часов, есть основания полагать, что основную долю сахаров, формируют продукты гидролиза целлюлозы (оболочки семян люпина). Поэтому в данной композиции Novozymes лимитирующими ферментами являются NS22074 и NS50010.

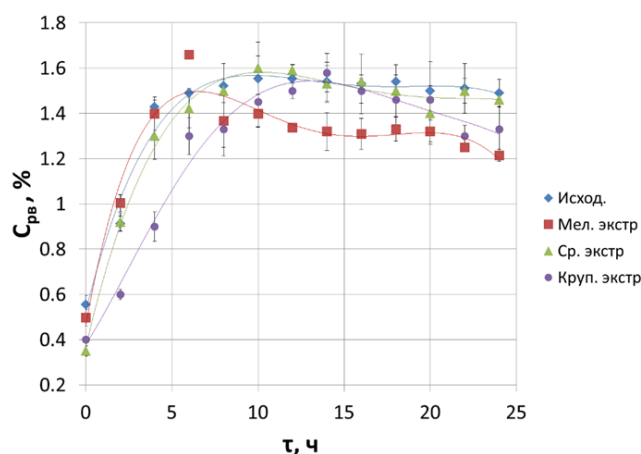


Рис. 5 – Концентрация редуцирующих веществ (в пересчете на глюкозу) (ферментативный гидролиз с препаратами Novozymes)

По результатам оценки выхода РВ была определена оптимальная фракция для ферментативного гидролиза ферментами Novozymes – мелкая с размерами частиц 0,5-1 мм, которая показала максимальный выход РВ за более короткий период гидролиза при сохранении рН в среде на достаточном для эффективной работы ферментов уровне.

На рис. 6 представлены результаты ферментативного гидролиза с препаратами

Сиббиофарм с предварительной варкой в воде (см. методику проведения экспериментов). Экструдированный люпин, как и в случае с ферментативным гидролизом препаратами Novozymes проявляет большую эффективность гидролиза. Максимум РВ (2,2%) достигается через 1,5 часа после начала обработки. Основной выход РВ наблюдается уже через час обработки, то есть после варки в воде с добавлением амилосубтилина.

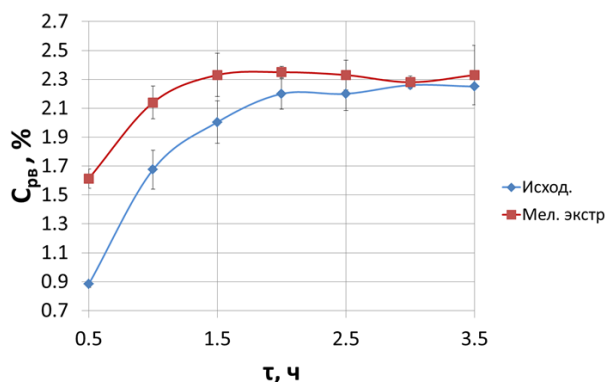


Рис. 6 – Концентрация редуцирующих веществ (в пересчете на глюкозу) (ферментативный гидролиз с препаратами Сиббиофарм)

Поскольку содержание крахмала в экстрадированном люпине намного меньше, чем в люпине без обработки, а количество продуктов деструкции легкогидролизуемых полисахаридов больше, процесс гидролиза происходит быстрее. Добавление целлюлолитических ферментов после водной обработки позволяет увеличить итоговый выход РВ, но не существенно. По-видимому, это связано с невысокой активностью целлюлазного препарата, который в данной композиции не является лимитирующим. Основным катализатором и стимулятором выхода РВ в данном процессе являются Амилоусубилин (А)

и Глюкаваморин ГЗх (Г), проявляющие себя в начале процесса.

Учитывая, что в двух экспериментах с композициями Novozymes и Сиббиофарм, наблюдаются различные активности ферментов и эффективность гидролиза, в дальнейшем имеет смысл разработки композиций, включающих как ферменты Novozymes, так и наиболее активные препараты Сиббиофарм. Подбор таких композиций может быть основан на анализе ИК-спектров люпина до и после обработок (рис. 7), который явно показывает изменение в химической структуре компонентов.

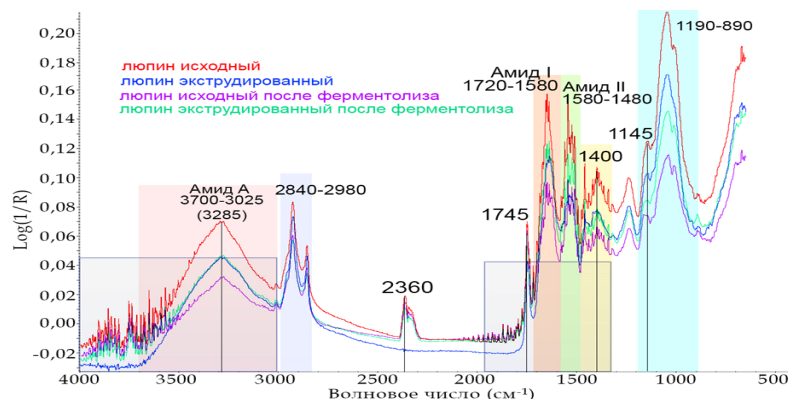


Рис. 7 – Сравнительные ИК-спектры люпина до и после обработок

Как видно из спектров исходного люпина и люпина после ферментализации интенсивность пиков, отвечающих за колебания связей в полисахаридах ($1190-890\text{ см}^{-1}$, 1145 см^{-1} , $4000-3000\text{ см}^{-1}$) существенно снижается. Точно определить, какие из групп полисахаридов и как (гексозаны, пентозаны) подвергаются гидролитическому распаду довольно затруднительно, так как в данных диапазонах наблюдается перекрывание полос. Полоса $1190-890\text{ см}^{-1}$, включающая в себя колебания гликозидных связей ($1175-1140\text{ см}^{-1}$) характеризует деструкцию целлюлозы, что сопоставляется со снижением интенсивности колебаний Н- связей целлюлозы в диапазоне $3700-3000\text{ см}^{-1}$. Вообще снижение интенсивности этой полосы главным образом связано с гидролизом полисахаридов. В ферментированных образцах также наблюдается снижение интенсивности в полосах Амид 1 и Амид 2. Возможно это связано с переходом части растворимых фракций белков и небелковых азотистых соединений в гидролизат при длительном ферментативном гидролизе. О форме и структуре белков, изменяющихся в процессе обработок, говорилось выше. Концентрация жиров также имеет тенденции к снижению в образцах после ферментализации (полоса $2980-2840\text{ см}^{-1}$ и карбонильная полоса при пике 1745 см^{-1}). Пик 2360 см^{-1} во многих источниках характеризуется С=О связью диоксида углерода. Отсутствие его на спектре экстрадированного люпина возможно объясняется термообработкой и десорбцией при сбросе давления, хотя пока не было подтверждено. Высокочастотные

колебания, появляющиеся в областях $4000-3500\text{ см}^{-1}$ и $1900-1350\text{ см}^{-1}$ соответствуют воде, которая всегда сопровождает в связанной или свободной форме продукты после ферментативного гидролиза и существенно влияет на форму спектров, что вызывает трудности в интерпретации диапазонов, характеризующих амидные связи основной цепи белков. Тем не менее, сохранение симметрии в спектрах в областях, отвечающих за связи в амидах, говорит о сохранении общей структуры растительных протеинов в люпине. Если сравнивать спектры экстрадированного люпина до ферментализации и после видно, что концентрация белка повышается (характерные диапазоны Амид 1 и Амид 2), что говорит о возможности получения белковых концентратов. Очевидно, что итоговая концентрация белков в продукте будет зависеть от качества проведенного избирательного гидролиза углеводов, поэтому ИК-спектрометрия образцов является важным инструментом в данном исследовании. Что касается количественного выхода белков, возможно их определение и по ИК спектрам, однако, учитывая наложение полос от полисахаридов, воды и триглицеридов, такая задача на данном этапе затруднительна, хотя возможна при получении более чистых концентратов, освобожденных от углеводов. Содержание сырого протеина (по общему содержанию азота) и истинного белкового азота (в пробах по Барнштейну) определяли классическим наиболее точным методом Кьельдаля. Результаты представлены на рисунке 8.

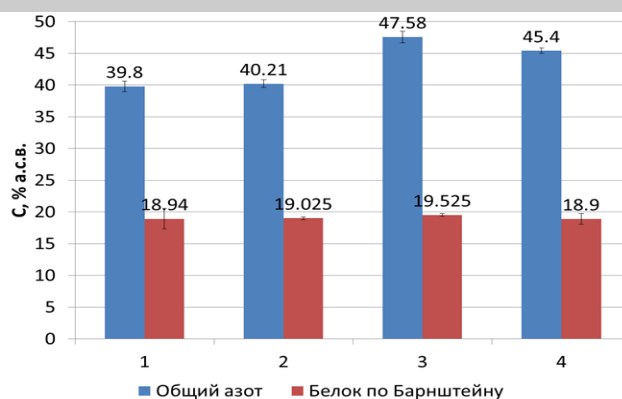


Рис. 8 – Концентрация сырого протеина и истинного белка (по Барнштейну) в твердых продуктах: 1) исходный люпин; 2) экструдированный люпин; 3) люпин после ферментативного гидролиза препаратами Novozymes; 4) люпин после ферментативного гидролиза препаратами Сиббиофарм

Выход сырого протеина после ферментативного гидролиза в твердом остатке достиг 47,58% а.с.в. в образце экструдированного люпина (обработка препаратами Novozymes). Удалось повысить концентрацию белка в итоговом продукте с 39,8%, то есть на 7,8 абсолютных процентов или на 19,54 относительных процентов. После обработки ферментами Сиббиофарм белок удалось повысить на 14%. Незначительное изменение в количественном содержании истинного белка говорит о том, что структура белкового азота в целом

не изменяется в процессе экструдирования и ферментативного гидролиза.

Была проведена сравнительная оценка аминокислотного состава экструдированных семян сои и люпина, а также люпинового белкового концентрата, полученного путем ферментации семян люпина, с целью дальнейшего применения в составе кормовых добавок и комбикормов для кормления сельскохозяйственных животных, птицы и аквакультуры. Аминокислотный состав исследованных образцов представлен на рисунке 9.

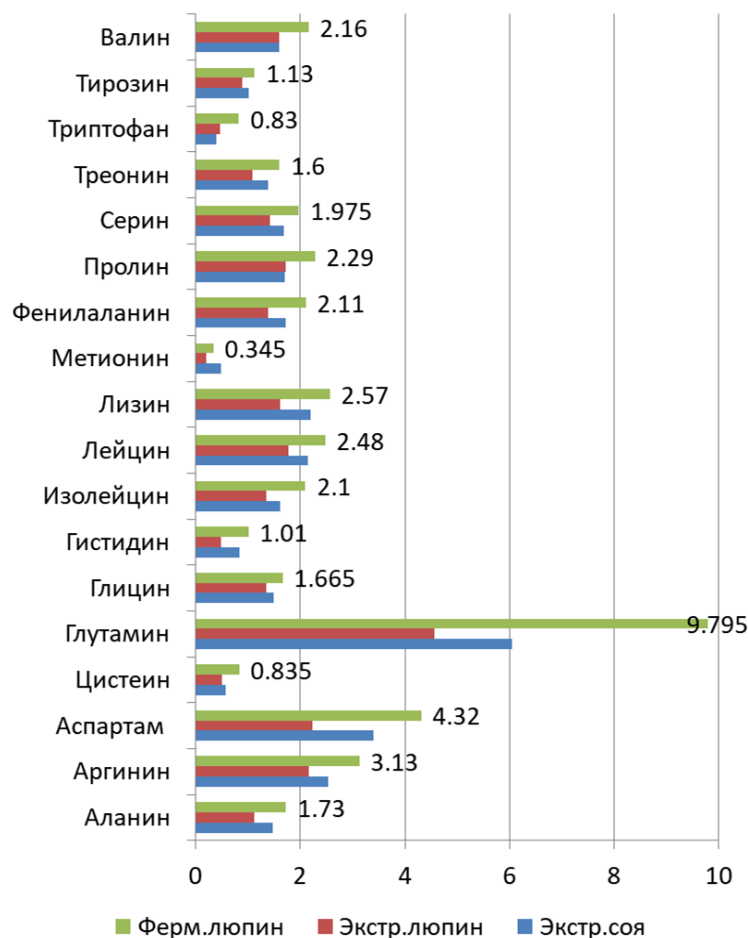


Рис. 9 – Сравнительный аминокислотный состав образцов (в % от общего белка)

Аминокислотный анализ образцов показывает, что содержание заменимых и незаменимых аминокислот (рис. 10) было в образце 1 на уровне 32,33%, в образце 2 – 25,95%, в образце 3 было выше по сравнению с другими образцами и составило – 42,0 % (от общего количества белка). В экструдированных семенах сои (образец 1) из фракции заменимых аминокислот наибольшее содержание глутамина – 6,04%; из фракции незаменимых аминокислот – аргинина 2,54% и лизина 2,21%. Количество серосодержащих аминокислот составило: метионина – 0,49% и цистеина – 0,57%. В экструдированных семенах белого люпина (образец 2) из фракции

заменяемых аминокислот наибольшее содержание глутамина – 4,57%, аспартама – 2,24%, из фракции незаменимых аминокислот: аргинина – 2,16 %, лейцина – 1,78%, валина – 1,60%. Количество серосодержащих аминокислот составило: метионина – 0,2% и цистеина – 0,51%. В люпиновом белковом концентрате (образец 3) из фракции заменимых аминокислот наибольшее содержание глутамина – 9,80%; аспартама – 4,32%, из фракции незаменимых аминокислот: аргинина – 3,13%, лизина – 2,57%, лейцина – 2,48%, валина – 2,16%. Количество серосодержащих аминокислот составило: метионина – 0,35% и цистеина – 0,84%.

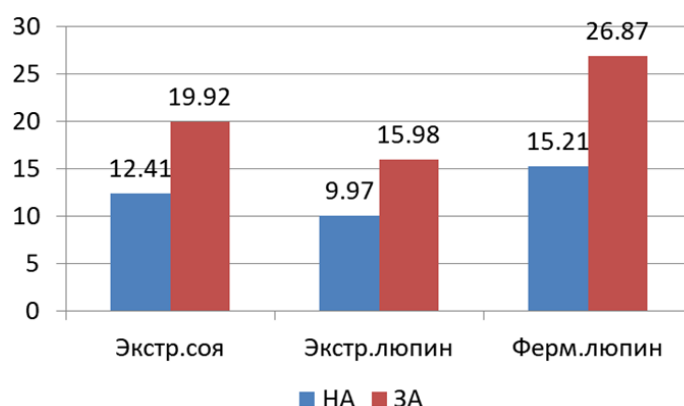


Рис. 10 – Содержание незаменимых аминокислот (НА) и заменимых аминокислот (ЗА) в образцах (в % от общего белка)

Исследованиями установлено, что ферментативная обработка семян люпина позволяет увеличить в них сумму аминокислот с 25,95 до 42,08%, в том числе заменимых аминокислот с 9,97 до 15,21%, незаменимых аминокислот с 15,98 до 26,87%. При ферментативной обработки в семенах люпина увеличивается содержание глутамина с 4,57 до 9,80%, аспартама с 2,24 до 4,32%, аргинина с 2,16 до 3,13%, лизина с 1,62 до 2,57%, лейцина с 1,78 до 2,48%, цистеина с 0,51 до 0,84%, метионина с 0,2 до 0,35%.

Ферментативный гидролиз углеводной фракции позволяет получить люпиновый белковый концентрат, который по сравнению с экструдированными семенами сои содержит больше: незаменимых аминокислот – на 2,8%, заменимых аминокислот на 6,95%. Люпиновый белковый концентрат превосходит экструдированную сою по содержанию глутамина – на 3,76%, аспартама – на 0,92%, аргинина – на 0,59%, лизина – на 0,36%, цистеина – на 0,27%.

Таким образом, исследованное сырье и кормовые добавки на их основе, возможно использовать в кормлении сельскохозяйственных животных, птицы и аквакультуры с целью балансирования рационов по аминокислотам, а также использовать в составе энерго-протеиновых кормовых добавок.

Проведенные исследования по ферментативному гидролизу экструдированного

люпина подтверждают возможность получения белковых концентратов путем избирательного ферментативного гидролиза углеводных компонентов, входящих в состав люпина. В дальнейшем необходим подбор композиций различных ферментов с наибольшей активностью, для достижения максимального гидролиза клетчатки, входящей в оболочку семян, а также предварительная экстракция семян от жиров. Экструдирование показало свою эффективность в процессе интенсификации ферментативного гидролиза.

Выводы. Результаты проведенного исследования получения белковых продуктов из люпина белого сорта Дега с применением ферментных комплексов показали эффективность предварительного экструдирования семян, которое позволяет почти в 2 раза сократить продолжительность ферментативного гидролиза углеводной фракции люпина. Оптимальной фракцией для гидролиза является размер частиц экструдированного люпина 0,5¹ мм. Наиболее эффективный гидролиз удалось осуществить с применением ферментных композиций, состоящих из препаратов Novozymes, особенно в части целлюлозных полисахаридов, однако отечественные препараты показали высокую эффективность в гидролизе крахмалистых полисахаридов. Учитывая эти обстоятельства имеет смысл создания комплексной ферментной композиции, которая позволит осуществить более полный

гидролиз углеводной фракции люпина и получить продукты с более высоким содержанием протеина. Остаточное содержание жира в белковом продукте также необходимо снижать благодаря предварительной экстракции. Выход сырого протеина после ферментативного гидролиза в твердом остатке достиг 47,58% а.с.в. в образце экструдированного люпина (обработка препаратами Novozymes). Удалось повысить концентрацию белка в итоговом продукте с 39,8%, то есть на 7,8 абсолютных процентов или на 19,54 относительных процентов.

Проведенные исследования по ферментативному гидролизу экструдированного люпина и полученные результаты подтверждают возможность получения белковых концентратов путем избирательного ферментативного гидролиза углеводных компонентов, входящих в состав люпина. Сравнительный аминокислотный состав показал

возможность использования полученного белкового концентрата в кормлении сельскохозяйственных животных, птицы и аквакультуры с целью балансирования рационов по аминокислотам.

Сведения о финансировании. Работа выполнена в рамках реализации программы Приоритет-2030. Коллектив авторов выражает благодарность Шурхасовой К.Д., к.т.н., с.н.с, заведующей лабораторией селекции зернобобовых культур ТатНИИСХ (о.с.п. ФИЦ Казанский научный центр РАН) за предоставленные образцы люпина сорта Дега; Зенитовой Л.А., д.т.н., проф., проф. кафедры технологии синтетического каучука ФГБОУ ВО «КНИТУ» за помощь в организации исследований ИК-спектроскопии; Холину К.В., к.х.н, доц., заведующему кафедрой физики ФГБОУ ВО «КНИТУ» за помощь в организации исследований с применением конфокальной микроскопии.

Литература

1. Gaponov N. V., Yagovenko G. L. The lupine significance for forage production: lupin-and-rape concentrate as a source of valuable nutrients for animal feeding // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2021. – T. 723. – №. 2. – С. 022005.
2. Chemical Characterization of White Lupin (*Lupinus albus*) Flour Treated by Extrusion Cooking and Aqueous Debitting Processes / Chamone M. E. R. et al. // Plant Foods Hum Nutr. 2023 Jun; 78(2): 292-298. doi: 10.1007/s11130-023-01050-0.
3. Extrusion of lupines with or without addition of reducing sugars: Effects on the formation of Maillard reaction compounds, partition of nitrogen and N ϵ -carboxymethyl-lysine, and performance of dairy cows / Manzocchi E. et al. // Journal of Dairy Science. 2023 Nov; 106(11): 7675-7697. doi: 10.3168/jds.2022-22902.
4. Effects of replacing soybean meal with raw or extruded blends containing faba bean or lupin seeds on nitrogen metabolism and performance of dairy cows / Mendowski S. et al. // Journal of dairy science. 2019 Jun; 102(6): 5130-5147. doi: 10.3168/jds.2018-15416.
5. Boukid F., Pasqualone A. Lupine (*Lupinus* spp.) proteins: Characteristics, safety and food applications // European Food Research and Technology. – 2022. – T. 248. – №. 2. – С. 345-356.
6. Development and characterization of extruded broken rice and lupine (*Lupinus albus*) / Oliveira C. T. et al. // American Journal of Plant Sciences. 2015 Aug; 6(12): 1928-1936. doi: 10.4236/ajps.2015.612194.
7. Multi-response surface optimisation of extrusion cooking to increase soluble dietary fibre and polyphenols in lupin seed coat / Zhong L. et al. // Lwt. 2021 Apr; 140: 110767. doi: 10.1016/j.lwt.2020.110767
8. Optimal Enzymatic hydrolysis of sweet lupine protein towards food ingredients / Pasarin D. et al. // Fermentation. – 2023 Jan; 9(3): 203. doi: 10.3390/fermentation9030203
9. Samel A., Wojciechowski K. Lupine Protein Enzymatic Hydrolysates Obtained in a Simultaneous Extraction-Hydrolysis Process as Foaming Agents // LWT. – 2024. – С. 116713.
10. Production of herbal protein isolates with the enzymatic hydrolysis technology / Leonid K. et al. // Int J Pharm Res Allied Sci. – 2020. 9(3): 10-5.
11. Kamran F. Enzymatic hydrolysis of lupin (*Lupinus angustifolius*) protein: Isolation and characterization of bioactive peptides: thesis Doctor of Philosophy. – Western Sydney University (Australia), 2017.
12. A fast and novel approach to evaluate technical enzyme preparations for an efficient protein hydrolysis / Großmann K. K. et al. // European Food Research and Technology. 2019 Apr. 245(8): 1695-1708. doi: 10.1007/s00217-019-03280-6
13. Культивирование *Candida guilliermondii* на углеводном ферментализате семян люпина сорта Дега / Д.Б. Просвириков, Д.В. Тунцев, Р.Т. Валеева, Л.М. Исмагилова // Бутлеровские сообщения. 2024. Т.80. №10. С.95-101.
14. Влияние предварительного экструдирования на компонентный состав семян белого люпина сорта Дега / Д.Б. Просвириков, Д.В. Тунцев, Р.Т. Валеева и др. // Бутлеровские сообщения, 2024. Т.80. №10. С.102-111.

Сведения об авторах:

Просвириков Дмитрий Богданович – доктор технических наук, профессор кафедры химической кибернетики, e-mail: prosvirnikov_dmi@mail.ru
Тунцев Денис Владимирович – доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой химической кибернетики, e-mail: tuncev_d@mail.ru
Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия
Гайнуллина Мунира Кабировна – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующая кафедрой технологии производства и переработки сельхозпродукции, e-mail: gainullinamun@yandex.ru
Касанова Надия Радиковна - кандидат сельскохозяйственных наук, старший преподаватель кафедры биологической и неорганической химии, e-mail: nadia-kasanova@mail.ru
Казанский государственный аграрный университет, г. Казань, Россия

PROTEIN CONCENTRATE FROM WHITE LUPINE OF DEGA VARIETY

D. B. Prosvirnikov, D. V. Tuntsev, M. K. Gaynullina, N. R. Kasanova

Abstract. The aim of this work is to obtain a vegetable protein concentrate for animal husbandry by enzymatic treatment of lupine and to evaluate its nutritional characteristics for use in animal husbandry. White lupine of Dega variety (harvest 2019, Republic of Tatarstan) was used in the study. Lupine seeds were pre-treated in an EM-150 feed extruder (Russia) at the production site of NTC GreenTex LLC (Kazan). The concentration of total nitrogen, true protein, fiber, fat, ash, pectin, and starch was determined in the seeds before and after extrusion. Enzymatic hydrolysis of lupine was carried out using enzyme preparations from Novozymes (Denmark) and OOO PO Sibbiopharm (Russia). Enzymatic hydrolysis was carried out in a laboratory shaker-incubator Kuhner ISF1-X (Switzerland) with subsequent separation of the solid and liquid fractions by centrifugation. The solid sediment (protein concentrate) was dried, the content of total and true nitrogen was determined. Most of the fat from the extruded lupine is released during enzymatic hydrolysis into a hydrolysate. In the case of Novozymes enzymes, the maximum yield of reducing substances (RS) (1.66%) is observed after 5-6 hours (without extrusion treatment - 10-12 hours (1.55%)); in the case of Sibbiopharm preparations, the maximum RS (2.2%) is achieved after 1.5 hours from the start of treatment. Infrared spectroscopy (Shimadzu, Japan) showed a change in the chemical structure of both carbohydrates and proteins. It was possible to increase the protein concentration in the final product from 39.8% to 47.58%. Evaluation of the amino acid composition on the NIRSTMDS 2500 analyzer showed that enzymatic treatment of lupine seeds allows increasing the amount of amino acids in them from 25.95 to 42.08%, including replaceable amino acids from 9.97 to 15.21%, essential amino acids from 15.98 to 26.87%. The resulting protein concentrate from lupine can be used in feeding farm animals and poultry in order to balance diets for amino acids.

Key words: lupine, protein concentrate, extrusion, enzymolysis, amino acids, protein, feed protein.

References

1. Gaponov NV, Yagovenko GL. The lupine significance for forage production: lupin-and-rape concentrate as a source of valuable nutrients for animal feeding. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing. 2021; Vol.723. 2. 022005 p.
2. Chamone MER. Chemical characterization of white lupine (*Lupinus albus*) flour treated by extrusion cooking and aqueous debittering processes. *Plant Foods Hum Nutr.* 2023 Jun; 78(2). 292-298 p. doi:10.1007/s11130-023-01050-0.
3. Manzocchi E. Extrusion of lupines with or without addition of reducing sugars: Effects on the formation of Maillard reaction compounds, partition of nitrogen and Nε-carboxymethyl-lysine, and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 2023 Nov; 106(11). 7675-7697 p. doi: 10.3168/jds.2022-22902.
4. Mendowski S. Effects of replacing soybean meal with raw or extruded blends containing faba bean or lupine seeds on nitrogen metabolism and performance of dairy cows. *Journal of dairy science.* 2019 Jun; 102(6): 5130-5147 p. doi: 10.3168/jds.2018-15416.
5. Boukid F, Pasqualone A. Lupine (*Lupinus* spp.) proteins: characteristics, safety and food applications. *European Food Research and Technology.* 2022; Vol.248. 2. 345-356 p.
6. Oliveira CT. Development and characterization of extruded broken rice and lupine (*Lupinus albus*). *American Journal of Plant Sciences.* 2015 Aug; 6(12): 1928-1936 p. doi: 10.4236/ajps.2015.612194.
7. Zhong L. Multi-response surface optimization of extrusion cooking to increase soluble dietary fiber and polyphenols in lupine seed coat. *Lwt.* 2021 Apr; 140. 110767 p. doi: 10.1016/j.lwt.2020.110767
8. Pasarin D. Optimal enzymatic hydrolysis of sweet lupine protein towards food ingredients. *Fermentation.* 2023 Jan; 9(3). 203 p. doi: 10.3390/fermentation9030203
9. Samel A, Wojciechowski K. Lupine protein enzymatic hydrolysates obtained in a simultaneous extraction-hydrolysis process as foaming agents. *LWT.* 2024; 116713 p.
10. Leonid K. Production of herbal protein isolates with the enzymatic hydrolysis technology. *Int J Pharm Res Allied Sci.* 2020; 9(3). 10-5 p.
11. Kamran F. Enzymatic hydrolysis of lupin (*Lupinus angustifolius*) protein: Isolation and characterization of bioactive peptides: thesis Doctor of Philosophy. Western Sydney University (Australia). 2017.
12. Grobmann KK. A fast and novel approach to evaluate technical enzyme preparations for an efficient protein hydrolysis. *European Food Research and Technology.* 2019 Apr; 245(8). 1695-1708 p. doi: 10.1007/s00217-019-03280-6
13. Prosvirnikov DB, Tuntsev DV, Valeeva RT, Ismagilova LM. [Cultivation of *Candida guilliermondii* on carbohydrate fermentolysate of lupine seeds of Dega variety]. *Butlerovskie soobshcheniya.* 2024; Vol.80. 10. 95-101 p.
14. Prosvirnikov DB, Tuntsev DV, Valeeva RT. [The influence of preliminary extrusion on the component composition of white lupine seeds of Dega variety]. *Butlerovskie soobshcheniya.* 2024; T.80. №10. S.102-111.

Authors:

Prosvirnikov Dmitriy Bogdanovich – Doctor of Technical Sciences, Professor of Chemical Cybernetics Department, e-mail: prosvirnikov_dmi@mail.ru

Tuntsev Denis Vladimirovich – Doctor of Technical Sciences, Professor, Head of Chemical Cybernetics Department, e-mail: tuncev_d@mail.ru

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia.

Gaynullina Munira Kabirovna – Doctor of Agricultural Sciences, Professor, Head of Technology of agricultural products production and processing Department, e-mail: gainnullinamun@yandex.ru

Kasanova Nadiya Radikovna – Ph.D. of Agricultural Sciences, senior lecturer of Biological and Inorganic Chemistry Department, e-mail: nadia-kasanova@mail.ru

Kazan State Agrarian University, Kazan, Russia.