

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОБЕЛКОВОГО КОРМОВОГО ПРОДУКТА ИЗ ЛЮПИНА

Д. Б. Просвириков, Д. В. Тунцев, М. К. Гайнуллина, О. А. Якимов, Н. Р. Касанова

Реферат. Целью работы являлась разработка технологии получения высокобелкового кормового продукта из люпина белого с последующей оценкой в нем содержания протеина. В работе использовали люпин белый Дега (г. Иваново, Россия, урожай 2024 год). Семена измельчали, подвергали различным режимам предварительной обработки, а затем - ферментативному гидролизу с препаратами ГК «Фермент» (Беларусь) при $t = 50^{\circ}\text{C}$, 130 мин^{-1} , $\text{pH} = 4,5-5,0$ 10 ч. Ферментную композицию, которая позволила получить максимальный выход редуцирующих веществ, определяли экспериментально по полному трехфакторному плану (фактор X1 – дозировка целлюлазного комплекса, 0,005-0,4% от субстрата в сырье, X2 – дозировка гемицеллюлаз, 0,33-3,0%, X3 – дозировка липазы, 0,06-0,4%, отклик Y1 – концентрация редуцирующих веществ в % в гидролизатах). На смеси твердых продуктов и гидролизатов культивировали дрожжи *Candida tropicalis* ВКПМ У-3 и *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-1136 при $t = 28-35^{\circ}\text{C}$, 90 мин^{-1} , $\text{pH} = 4,8-5,0$ в течение 24 часов. После сушки итоговый ферментированный продукт измельчали и определяли содержание сырого протеина. Полученный в ходе работы концентрат содержал $47,2 \pm 1,12\%$ сырого протеина (при ферментации с участием дрожжей *Candida tropicalis*) и $44,9 \pm 1,33\%$ (с *Saccharomyces cerevisiae*), что демонстрирует высокую эффективность разработанной технологии по обогащению продукта протеином. Впервые разработана технология двухстадийной биоконверсии семян люпина в жидкой фазе по схеме «ферментативный гидролиз — культивирование дрожжей», обеспечивающая целевой гидролиз полисахаридов с сохранением белковых фракций.

Ключевые слова: люпин, белковый концентрат, мультиферментная композиция, технология, ферментативный гидролиз, микробный кормовой белок, дрожжи, белковый изолят, кормопроизводство.

Введение. Зернобобовые культуры играют значимую роль в устойчивом сельском хозяйстве, обеспечивая человека и животных ценными источниками белка. Они эффективно используются в рационах жвачных как концентрированные корма. Исследования подтверждают возможность замены сои, как основного источника растительных протеинов, на горох, фасоль, кормовые бобы, нут, чечевицу, люпин белый, люпин желтый, люпин узколистный без ущерба для продуктивности [1]. Однако наличие антипитательных факторов ограничивает их использование в кормах для моногастричных животных. Современные сорта люпина широко применяются в животноводстве во всем мире. Их семена содержат около 32–36% сырого протеина и до 40% некрахмальных полисахаридов. Люпин рассматривается как устойчивая альтернатива сое, однако вариабельность питательной ценности между сортами и ограниченные селекционные усилия требуют дальнейших исследований и селекции данной культуры. Бобовые, включая сою, люпин, горох и фасоль, выращиваются как основная культура во всем мире. Благодаря богатству незаменимыми аминокислотами и общими фенольными соединениями бобовые могут быть включены в рацион кормов животных, как источник белка. Кроме того, белки бобовых обладают хорошими функциональными свойствами для использования в качестве кормового ингредиента. Известно [2], что по кормовой ценности экструдированный концентрат на основе люпина не уступает экструдированному концентрату на основе сои и позволяет получать хорошие приросты живой массы животных и птицы. Концентрат на основе люпина с добавлением ферментов по биологической

ценности равен полножирной сое.

При использовании зерна люпина узколистного с включением органического микроэлементного комплекса данный вид сырья может быть также использован как альтернатива сое в белковых концентратах [3].

Тем не менее, замена сои и соевого шрота на менее прихотливый к выращиванию люпин или продукты из него в рационах для большинства интенсивно выращиваемых животных, птиц и рыб возможна при условии поддержания постоянного уровня лизина, метионина и усвояемой энергии, а также снижения антипитательных факторов. Это делает люпин экономически конкурентоспособным во многих обстоятельствах. Для достижения свойств продуктов из люпина, сопоставимых с соей или соевым шротом, необходима эффективная биоконверсия растительного комплекса семян люпина.

Учитывая, что некоторые сорта люпина, да и бобовых в целом, содержат антипитательные вещества [4], предварительная обработка семян белкового растительного сырья играет вдвойне важную роль [1, 5].

Учитывая тот факт, что в составе нерастворимых и трудногидролизуемых полисахаридов присутствует в основном целлюлоза, для ее эффективной ферментативной конверсии требуются правильно подобранные ферментные композиции целлюлаз. Как правило, ферментативному гидролизу для получения глюкозы подвергаются предварительно обработанные материалы. Даже наличие стадии предварительной обработки требует синергического действия трех основных типов ферментов при гидролитической деструкции целлюлозы - эндоглюканазы, целлобиогидролазы

и β -глюкозидазы [6].

Полисахаридный комплекс любого лигно-целлюлозного сырья, в том числе и оболочки бобовых семян, включает в себя и гемицеллюлозы, тесно связанные с целлюлозой. Эффективный гидролиз таких комплексов подразумевает использование ферментов не только с целлюлолитической активностью, но и с гемицеллюлазной (в частности ксиланазной) [7].

В литературе встречается довольно большое количество разработок и предложений по мультиферментным комплексам для тех или иных видов растительных материалов, основываясь на которых, можно предположить потенциальные приблизительные составы мультиэнзимных комплексов для решения задач эффективной гидролитической деструкции лигно-целлюлозной матрицы оболочек бобовых, в частности люпина, или, по крайней мере, наметить пути разработки таких комплексов [8, 9].

Очевидно, дозы ферментных препаратов в композиции должны зависеть от сложности и активности ферментов, от компонентного состава сырья, а эффективность их использования будет определяться предварительной обработкой сырья, температурой, pH и продолжительностью гидролиза.

Получение высокобелковых продуктов из люпина требует понимания технологических особенностей переработки данного вида сырья, которая тесно связана с его ферментативной обработкой. Однако влияние ферментативного гидролиза на функциональные свойства бобовых семейства *Lupinus* до сих пор исследовалось мало. Люпин является перспективным сырьем из-за высокого содержания белков (от 32 до 37% от сухого веса) и превосходного аминокислотного профиля. Среди сладких видов люпина (*Lupinus luteus*, *Lupinus angustifolius* и *Lupinus albus*) желтый люпин (*Lupinus luteus*) обладает очень высоким содержанием белка и высоким содержанием клетчатки [10].

Обзор литературы по ферментативному гидролизу выявляет методологические проблемы, при которых нерастворимые и нефункциональные фракции гидролизатов бобовых белков удаляются перед анализом [11]. Эта литература может поставить под сомнение обоснованность общепринятого мнения о том, что ферментативный гидролиз всегда полезен для функциональности белка. Поскольку большинство растительных белков состоят из смеси различных белковых фракций, которые имеют различные изоэлектрические точки [12], необходима модификация их характеристик для улучшения их функциональных свойств белков, среди которых важными являются растворимость и эмульгирующие свойства. Тем не менее, все же большинство работ включают в технологию белковых продуктов из бобовых, в частности люпина, стадии ферментативного гидролиза [13, 14].

Эффективный ферментативный гидролиз, подразумевающий разрушение лигноцеллюлозного комплекса семян люпина с

сохранением белковых структур является довольно сложной задачей. Как показывают исследования ферментативный гидролиз, как правило, сопровождается переходом растворимой фракции белков в гидролизаты. Если рассматривать культуру люпина как белковый источник для кормовых целей, нет необходимости в получении изолятов белка. Гораздо правильнее оставить все белковые фракции в сырье, но в измененных после ферментативного гидролиза аминокислотных профилях, а сахара, полученные после гидролиза полисахаридов, использовать как питательную среду для культивирования микробного кормового белка, получая на гидролизатах дополнительный источник протеина с иным аминокислотным составом. Возможно, в композиции из растительных белков люпина и микробного белка, полученного на углеводных гидролизатах люпина, с помощью регулирования режимов двухстадийной обработки «ферментативный гидролиз-культивирование» балансировать аминокислотный состав получаемых высокобелковых кормовых продуктов.

В литературе не встречается процессов совмещенной двухстадийной обработки «ферментативный гидролиз-культивирование» в жидкой фазе, однако имеется довольно много сведений о твердофазной ферментации бобовых [15, 16, 17], которые одновременно обрабатываются ферментами и культурами микроорганизмов, хотя в этом процессе не до конца ясны механизмы взаимного влияния ферментов, микроорганизмов и субстратов, режимы обработки. В разных исследованиях приводятся противоречивые сведения по качеству получаемых белковых продуктов, в частности изолятов белка [18].

С другой стороны, во время жидкофазной ферментативной обработки белкового растительного сырья целесообразно осаждать растворенные белки в более высокомолекулярные комплексы, и оставлять этот осадок в твердом продукте в качестве источника протеина в готовой кормовой добавке, а для питания микроорганизмов использовать сахара, полученные после поэтапного ферментативного гидролиза углеводной фракции люпина, и дополнительно введенные минеральные среды для их роста. Дрожжи, выращенные на углеводных гидролизатах, имеют иной аминокислотный состав и в итоговом продукте повышают общее содержание сырого протеина.

Учитывая сложный углеводный и белковый состав семян люпина, необходимо помимо предварительной обработки для удаления растворимых антипитательных веществ применять комплексные ферментные системы для целевого снижения содержания антипитательных полисахаридов, таких как клетчатка, гемицеллюлозы. Разработка ферментных мультиэнзимных композиций основывается на количественном содержании индивидуальных компонентов-субстратов в сырье, которые необходимо гидролизовать соответствующими ферментами с заданной активностью.

Целью работы являлась разработка технологии получения высокобелкового кормового продукта из люпина белого с последующей оценкой в нем содержания протеина.

Впервые разработана технология двухстадийной биоконверсии семян люпина в жидкой фазе по схеме «ферментативный гидролиз — культивирование дрожжей», обеспечивающая целевой гидролиз полисахаридов с сохранением белковых фракций. Работа устраняет малоизученный аспект взаимного влияния режимов гидролиза и микробиологического роста на гидролизатах на содержание протеина в итоговом продукте, что делает технологию конкурентоспособной альтернативой соевым протеинам.

Условия, материалы и методы. В работе использовали люпин белый сорта Дега, собранный в г. Иваново, Россия, урожай 2024 году. Сырье предварительно измельчали на лабораторной мельнице «ВЬЮГА ЗМТ» (Россия), просеивали через сита с ячейками 0,1-0,5 мм. Компонентный состав сырья в массовых % от абсолютно сухого вещества (а.с.в.): влага - $6,87 \pm 0,03$, целлюлоза - $16,81 \pm 0,27$, легкогидролизуемые полисахариды - $21,9 \pm 1,21$, лигнин - $0,24 \pm 0,01$, крахмал -

$5,1 \pm 0,01$, жир - $9,98 \pm 0,02$, экстрактивные вещества - $1,81 \pm 0,02$, общий азот - $37,62 \pm 0,32$, сырая зола - $5,15 \pm 0,15$. Для проведения ферментативного гидролиза были использованы ферментные препараты ГК «Фермент» (Республика Беларусь). Расчетные дозировки в % от массы субстрата: Целлюлазный комплекс-0,1, Белазим ГЦ комплекс бета-глюконазы (6800) и ксиланазы (550) - 0,45, Ксиланаз - 0,1, Бетаманназа - 0,2, Липрозим С (группа 1) - 0,1, Белазим ХА альфа-амилаза - 0,2, Эльзим ГА жидкая глюкоамилаза (3500) - 0,1.

Ферментативный гидролиз люпина проводили следующим образом. В стерилизованные колбы 750 мл помещали подготовленное сырье (35,0 г) с известной влажностью (рис. 1), ферментную композицию в заданном количестве и соотношении (разведение водой 5 мл) и буфер (лимонная кислота/гидроксид натрия) в расчетном количестве (200 мл), колбы закрывали ватно-марлевым тампоном. Ферментативный гидролиз проводили в лабораторном шейкере-инкубаторе Kuhner ISF1-X (Швейцария) (рис. 2) при $t = 50^\circ\text{C}$, 130 мин^{-1} , $\text{pH}=4,5-5,0$, в течение 10 часов. Продолжительность гидролиза выбрана на основании ранее проведенных исследований.



Рис. 1 – Подготовка к полному трехфакторному эксперименту



Рис. 2 - Ферментативный гидролиз в лабораторном шейкере-инкубаторе

Эксперимент проводили по полному трехфакторному плану (табл. 2) на двух уровнях варьирования факторов. Первый фактор X1 – дозировка целлюлазного комплекса (R цф, % от субстрата в сырье), X2 – дозировка гемицеллюлаз (Белазим ГЦ+ксилаза+бетаманназа) (R гф, % от субстрата в сырье), X3 – дозировка липазы ЛИПРОЗИМ С (R жф, % от субстрата в сырье). План эксперимента представлен в таблице 1. Функция отклика: Y1 – концентрация редуцирующих веществ (РВ) в % в гидролизатах после ферментативного гидролиза (характеризует степень конверсии

углеводного комплекса люпина). Для оценки воспроизводимости опыта в центре плана (ЦП) было дополнительно поставлено 3 параллельных опыта. Диапазоны варьируемых дозировок выбирались таким образом, чтобы центр плана приблизительно попадал в теоретически расчетные дозировки. Теоретические дозировки ферментов рассчитывали, учитывая активность индивидуальных ферментов и концентрацию субстрата (целлюлоза, легкогидролизуемые полисахариды, крахмал, жир). Максимальная дозировка в диапазоне варьирования – двукратная от теоретической.

Таблица 1- План эксперимента

№ опыта	X1 R цф, % от субстрата в сырье	X2 R гф, % от субстрата в сырье	X3 R жф, % от субстрата в сырье
1	0,005	0,336	0,06
2	0,4	0,336	0,06
3	0,005	3,0	0,06
4	0,4	3,0	0,06
5	0,005	0,336	0,4
6	0,4	0,336	0,4
7	0,005	3,0	0,4
8	0,4	3,0	0,4
ЦП1	0,2025	1,668	0,23
ЦП2	0,2025	1,668	0,23
ЦП3	0,2025	1,668	0,23

Через 6, 8 и 10 часов из колб отбирали пробы гидролизата, центрифугировали на центрифуге Biobase (Китай) при 10000 мин⁻¹ 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, основанный на способности редуцирующих сахаров восстанавливать медно-щелочной реактив с образованием оксида одновалентной меди (Cu₂O), что позволяет количественно оценить содержание сахаров в образце). Полученные экспериментальные данные обрабатывали в программе Excel с получением регрессионной модели выхода РВ (функция Y1) в зависимости от концентрации ферментов (X1, X2, X3) и времени ферментативного гидролиза Т.

После определения состава ферментной композиции для ферментативного гидролиза, опыт повторили при различных режимах предварительной обработки:

1 – без предварительной обработки (контроль);

2 – предварительное удаление жира липазой 1 ч, в буфере с pH=8 и t=42°C, центрифугирование, взвешивание твердого остатка, влажности, далее ферментативный гидролиз обработанного твердого остатка при дозировках, позволяющих получить максимальное содержание редуцирующих веществ;

3 – предварительное удаление крахмала в присутствии амилазы 0,5 ч, t=54°C в буфере с pH=5, расчетная дозировка Белазим ХА альфа-амилаза; далее 0,5 ч t=54°C pH=4,5, расчетная дозировка Эльзим ГА жидкая глюкоамилаза (3500), центрифугирование, взвешивание твердого остатка, влажности, далее ферментативный гидролиз обработанного твердого остатка;

4 – предварительное удаление жира и водорастворимых компонентов варкой в воде 1 ч, t=80°C, центрифугирование, взвешивание твердого остатка, влажности, далее ферментативный гидролиз обработанного твердого остатка. Выбор температур и pH для проведения ферментативного гидролиза осуществляли в соответствии с рекомендациями завода-изготовителя ферментов ГК «Фермент» (Республика Беларусь), с учетом максимальной активности индивидуальных ферментов.

Пробы отбирали через 2, 4, 6, 8 ч после начала гидролиза, не считая времени предварительной обработки. В гидролизатах определяли РВ_{max} (%), по окончании гидролиза – в твердых остатках определяли CN_{тв} (%) методом Кьельдаля, подсчитывали конверсию углеводов K_{угв max} (%). Гидролизаты после отделения твердой фракции были простерилизованы нагревом смеси до 80-85°C с одновременным осаждением изолятов растительного белка. Изоляты отделяли от жидкости на центрифуге Biobase (Китай) при

10000 мин⁻¹ в течение 5 минут, и после сушки определяли содержание общего азота (CN_{из}, %) в изолятах. Все измерения проводили в трех повторностях.

После определения оптимального режима предварительной обработки, ферментативный гидролиз повторили с последующим культивированием дрожжей *Candida tropicalis* и *Saccharomyces cerevisiae* на смеси твердых продуктов и гидролизатов. В исследовании использовали предварительно засеянные на агаризованной питательной среде культуры одноклеточных дрожжей *Candida tropicalis* ВКПМ Y-3 и *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1136, пригодные для производства кормового белка. Оптимальная температура для роста составляет 28–35°C, pH 4,8–5,0 (режимы, рекомендованные Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» для микроорганизмов, представленных в каталоге). Выбор культур основывался на предыдущем исследовании [19], в котором показана эффективность культивирования микроорганизмов на различных гидролизатах растительного сырья.

В охлажденные колбы с белковым продуктом и гидролизатом добавляли суспензию чистой культуры дрожжей, разбавленной в 30 мл стерильной воды, компоненты питательной среды ((NH₄)₂SO₄, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, K₂HPO₄, KCl, Ca(NO₃)₂, NaCl, дрожжевой автолизат). Колбы помещали в шейкер-инкубатор Kuhner ISF1-X (Швейцария) и выдерживали при температуре 28–35°C, pH 4,8–5,0 в течение 24 часов при оборотах 90 мин⁻¹. Для поддержания pH на оптимальном уровне 4,8–5,0 ед. в процессе роста биомассы дрожжей каждую среду подкисляли лимонной кислотой либо подщелачивали аммиачной водой. Оценка физиологического состояния дрожжевых клеток в смеси с субстратом проводилась методом микроскопии на оптическом микроскопе Микмед-6 (Россия) при увеличении (x450). По окончании процесса культивирования содержимое колб разливали на подносы и сушили при температуре 65°C в сушильном шкафу в течение 24 часов. После сушки итоговый продукт измельчали и определяли в нем содержание сырого протеина методом Кьельдаля (ГОСТ 13496.4-2019).

Сравнительные эксперименты (4 режима предварительной обработки) проводились в трехкратной повторности, результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Достоверность различий между средними значениями оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости принят равным p < 0,05.

Результаты и обсуждение. В таблице 2 представлены результаты проведения полного трехфакторного эксперимента.

Таблица 2 – Результаты полного трехфакторного эксперимента

№ опыта	X1 R цф, %	X2 R гф, %	X3 R жф, %	6 ч РВ, %	8 ч РВ, %	10 ч РВ, %
1	0,005	0,336	0,06	1.4688	1.3719	0.8567
2	0,4	0,336	0,06	1.8262	1.3073	1.2429
3	0,005	3,0	0,06	2.2306	1.2429	1.3719
4	0,4	3,0	0,06	1.8589	1.5011	1.0819
5	0,005	0,336	0,4	1.6633	1.5984	1.0175
6	0,4	0,336	0,4	1.3073	1.0819	1.2751
7	0,005	3,0	0,4	1.3396	1.2429	1.5984
8	0,4	3,0	0,4	0.7596	1.8262	1.0498
ЦП1	0,2025	1,668	0,23	1.5751	2.1215	1.7936
ЦП2	0,2025	1,668	0,23	1.5012	1.8916	1.6141
ЦП3	0,2025	1,668	0,23	1.5984	1.9243	1.5659

Как видно из таблицы 2, максимальный выход редуцирующих веществ 2,2306% наблюдается в опыте №3, в котором использована ферментная композиция следующего состава: целлюлаза (X1) – 0,005%, гемицеллюлаза (X2) – 3,0%, липаза (X3) – 0,06%. Продолжительность ферментативного гидролиза – 6 ч. Полученные данные не раскрывают закономерностей влияния состава ферментной композиции и продолжительности ферментативного гидролиза на выход РВ, хотя это является основополагающим фактором при разработке мультисубстратных композиций под конкретные биотехнологические задачи. Взаимодействие ферментов друг с другом и их влияние на образующиеся продукты в условиях гидролиза, особенно гидролиза углеводной фракции люпина, мало изучено, но во многих работах такие сообщения о взаимовлиянии имеются [20]. Так, в зависимости от субстратов целлюлазы могут ингибироваться присутствием липаз, ксиланаз. К тому же, само действие ферментов может подавляться образующимися продуктами во время гидролиза – лигнинными комплексами, экстрактивными веществами и другими [21].

После обработки экспериментальных данных в программе Excel была получена регрессионная модель выхода РВ (функция Y1) в зависимости от концентрации ферментов (X1, X2, X3) и продолжительности ферментативного гидролиза T:

$$Y1 = (-0.64 \cdot T^2 + 0.095 \cdot T + 1.7274) + (-2.28 \cdot T^2 + 0.3947 \cdot T - 1.6636) \cdot (X1 - 0.202) / 0.197 + (-0.31 \cdot T^2 + 0.715 \cdot T - 0.3182) \cdot (X2 - 1.668) / 1.332 + (-4.02 \cdot T^2 + 7.265 \cdot T - 3.2019) \cdot (X3 - 0.23) / 0.17 + (-8.24 \cdot T^2 + 13.008 \cdot T - 4.958) \cdot (X1 - 0.202) \cdot (X2 - 1.668) / 0.262 + (-2.06 \cdot T^2 + 3.0468 \cdot T - 1.4551) \cdot (X1 - 0.202) \cdot (X3 - 0.23) / 0.033 + (-3.6 \cdot T^2 + 6.277 \cdot T - 2.6774) \cdot (X2 - 1.668) \cdot (X3 - 0.23) / 0.226 + (-1.65 \cdot T^2 + 2.493 \cdot T - 0.838) \cdot (X1 - 0.202) \cdot (X2 - 1.668) \cdot (X3 - 0.23) / 0.045$$

Адекватность полученной регрессионной модели оценивалась с помощью F-критерия Фишера, при сопоставлении расчетных данных с экспериментальными. Результаты моделирования в сравнении с экспериментальными данными представлены на рисунке 3.

Максимальная абсолютная погрешность модели составляет 0,0584% (в % РВ), максимальная относительная погрешность – 4,8%.

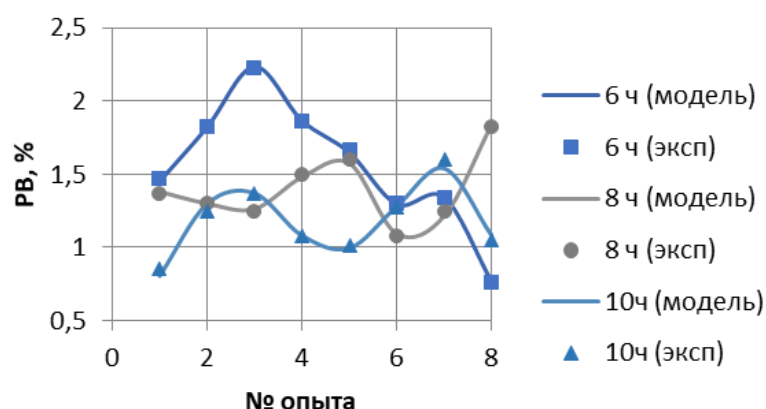


Рис. 3 – Расчетные и экспериментальные данные выхода РВ

По результатам ферментативного гидролиза была определена ферментная композиция (опыт №3) (рис. 4), при которой достигалось наибольшее содержание РВ в гидролизатах (2,231%), и, соответственно, наибольшая конверсия углеводов (34%). Максимальный

выход редуцирующих веществ наблюдался на 6-м часу ферментативного гидролиза, после чего при дальнейшем увеличении длительности процесса выход снижался. Это можно объяснить снижением активности ферментов в результате образования и накопления

продуктов гидролиза, приводящим к обратному ингибированию ферментативной реакции. В результате продление гидролиза свыше 6 часов не способствует дальнейшему увеличению выхода моносахаров.

Таким образом, наиболее эффективной ферментной композицией из ферментных препаратов ГК «Фермент» для ферментативного гидролиза люпина является

R цф : R гф : R жф (0,005:3,0:0,06) в % от массы субстрата. Продолжительность гидролиза при такой композиции – 6 ч. На 8 часу гидролиза для достижения максимального выхода РВ необходима композиция R цф : R гф : R жф (0,4:3,0:0,4). 10-й час гидролиза еще более снижает максимальный выход РВ, в связи с чем последующий гидролиз проводили в течение 6-8 часов.

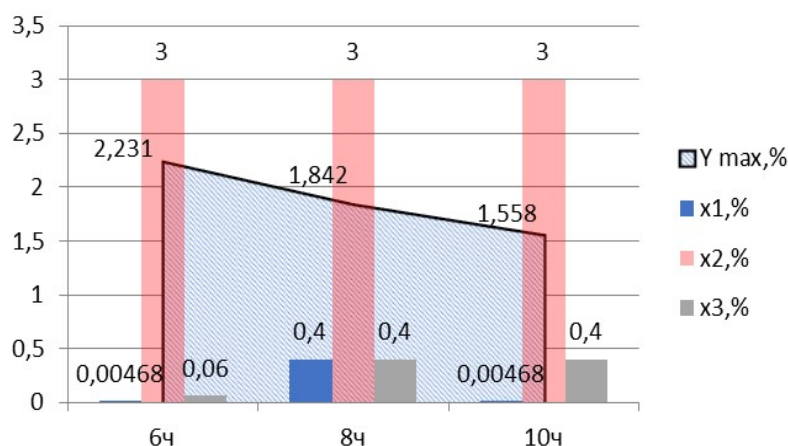


Рис. 4 – Ферментные композиции для ферментативного гидролиза люпина

Учитывая сложный компонентный состав люпина, а также исключения взаимовлияния ферментов друг на друга, были отработаны различные виды предварительной обработки измельченного сырья перед гидролизом. Режимы предварительной обработки: 1 - без предварительной обработки (контроль), повтор опыта №3; 2 - предварительное удаление жира липазой (1 ч, в буфере с pH=8 и t=42°C, центрифугирование, взвешивание твердого остатка, влажности, далее ферментативный гидролиз обработанного твердого остатка (опыт №3); 3 - предварительное удаление крахмала в присутствии амилазы (0,5 ч, t=54 °C в буфере с pH=5, расчетная дозировка Бела-зим ХА альфа-амилаза; далее 0,5 ч t =54°C pH=4,5, расчетная дозировка Эльзим ГА жидкая глюкоамилаза (3500), центрифугирование, взвешивание твердого остатка, влажности, далее ферментативный гидролиз обработанного твердого остатка (опыт №3), 4 - предварительное удаление жира и водорастворимых компонентов варкой в воде (1 ч, t=80°C, центрифугирование, взвешивание твердого

остатка, влажности, далее ферментативный гидролиз обработанного твердого остатка (опыт №3).

Ферментативный гидролиз проводили при дозировках, полученных при ПФЭ: первые 6 часов R цф : R гф : R жф (0,005:3,0:0,06), t=55°C, pH=5.5, последующие 2 часа при R цф : R гф : R жф (0,4:3,0:0,4), t=50°C, pH=5.0. Пробы отбирали через 2,4,6,8 ч после начала гидролиза, не считая времени предварительной обработки. В гидролизатах определяли РВ (РВ_{max}, %), по окончании гидролиза - в твердых остатках определяли CN_{тв} (%) методом Кьельдаля, подсчитывали конверсию углеводов (K_{угв max}, %). Гидролизаты после отделения твердой фракции были простерилизованы кипячением. Во время кипячения в гидролизатах выпадал белый осадок в виде хлопьев (изолят растительного белка), который также был отделен от жидкости центрифугированием и проанализирован на содержание общего азота (CN_{из}, %). В таблице 3 и на рис. 5 представлены результаты эксперимента.

Таблица 3 – Результаты ферментативного гидролиза люпина с предварительной обработкой

Показатели	Режимы предварительной обработки			
	1	2	3	4
CN _{тв} в твердом остатке, %	30,99±1,55	26,84±1,34	26,32±1,32	35,45±1,77
CN _{из} в изоляте белка, %	68,66±3,43	77,64±3,88	84,38±4,22	51,14±2,56
РВ _{max} *10 ⁻¹ ,	17,6±0,88	5,7±0,29	3,4±0,17	5,6±0,28
K _{угв max} , %	24,28±1,21	12,14±0,61	7,34±0,37	11,97±0,59
t, °C	-	42±2,1	54±2,7	80±4
pH	-	8±0,4	4,5±0,23	6,7±0,33

P<0,05

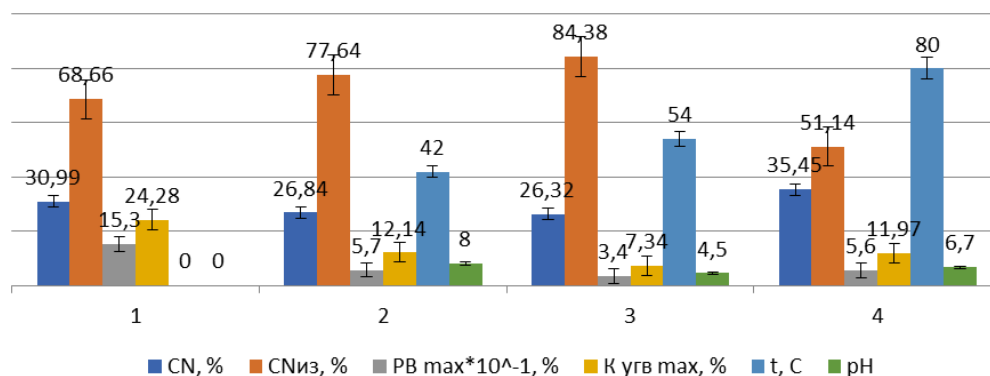


Рис. 5 - Результаты ферментативного гидролиза люпина с предварительной обработкой

Из данных видно, что содержание CNтв в твердых остатках снижается относительно исходного, что объясняется переходом в гидролизат растворимых альбуминов и части глобулинов растительного белка. Аналогичные результаты наблюдались и у коллег, например, в [21], где сообщается, что в основном изолят белка люпина имел концентрацию сырого протеина $82,50 \pm 0,88\%$ с высоким содержанием глицина/глутамин, аргинина и аспарагиновой кислоты/аспарагина.

Так, изолят растворимых белков в опыте 3 (предварительное удаление крахмала в присутствии амилазы) содержит общий азот $CN_{из}=84,38\%$. Очевидно, в его состав входят и растворенные после гидролиза сахара. Растворимость белков люпина и переход их в гидролизат после предварительной обработки повышается, особенно при повышении pH и температуры предварительной обработки.

Различия в эффективности предварительной обработки статистически значимы. Дисперсионный анализ подтвердил существенное влияние способа предварительной обработки на конечные показатели ($p < 0,05$). Например, вариант №3 – предварительное удаление крахмала ферментами – обеспечил содержание протеина в изоляте $84,38 \pm 4,22\%$, что

достоверно выше, чем у варианта №4 (варка в воде; $51,14 \pm 2,56\%$, $p < 0,05$). Таким образом, применение амилолитической обработки сырья повышает эффективность последующего ферментализа.

Содержание PB в зависимости от предварительной обработки не удалось адекватно оценить, поскольку после обработок твердые остатки центрифугировались и помещались в новые буферные растворы, в связи с чем остаточные содержания PB в гидролизатах составили 0,34-0,57%. Вероятно, большая часть растворимых углеводов была удалена на этапе предварительных обработок. Без центрифугирования (опыт №1) показал сопоставимые значения PB с опытом в полнофакторном эксперименте (при 8 часах). По результатам исследования влияния предварительной обработки установлено, что предварительное удаление крахмала в присутствии амилазы ферментами ГК «Фермент» позволяет получить изоляты с максимальным содержанием сырого протеина ($84,38\%$), при этом в твердом остатке протеина остается 26,32%.

На рис. 6 представлены микрофотографии твердого остатка после ферментативного гидролиза и предварительной обработки. Для сравнения представлены обработки №3 и №4.

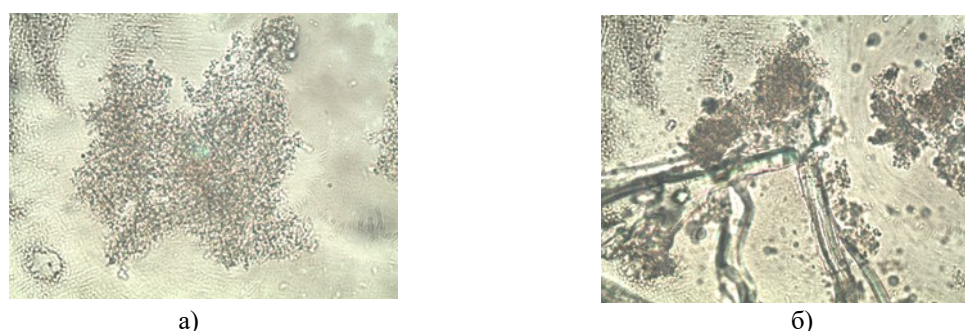


Рис. 6 – Твердый остаток после ферментативного гидролиза и предварительной обработки: а) в присутствии амилазы (0,5 ч, $t=54^\circ\text{C}$ в буфере с $\text{pH}=5$, расчетная дозировка Белазим ХА альфа-амилаза; далее 0,5 ч $t=54^\circ\text{C}$ $\text{pH}=4,5$, расчетная дозировка Эльзим ГА жидкая глюкоамилаза (3500); б) варкой в воде 1 ч, $t=80^\circ\text{C}$

Предварительная обработка амилолитическими ферментами (рис. 6, а) с последующим ферментативным гидролизом позволяет более полно провести гидролиз – на

фотографии частицы выглядят равномерно пористыми, со сглаженными краями. Возможно влияние предварительной обработки амилазами способствует при

последующем гидролизе более интенсивному проникновению остальных ферментов в структуру углеводной матрицы, и, как следствие более полному гидролизу, хотя это нельзя точно доказать по конечным выходам РВ в оставшихся гидролизатах. Однако, косвенный показатель – содержание сырого протеина в твердом остатке и высокое содержание протеина в изоляте белка свидетельствует о высокой растворимости белков, которая, возможно является следствием более эффективного гидролиза. Предварительная варка водой менее способствует гидролизу, что видно на фотографиях – в твердом остатке имеются включения растительных волокон, частицы более плотные и агломерированные, и менее пористые. Также можно сделать вывод о меньшей эффективности предварительной варки водой по показателям содержания сырого протеина в твердом остатке и изоляте.

Жидкая фаза с перемешиванием обеспечивает интенсификацию массообменных процессов, реакций гидролиза, высвобождение продуктов деструкции углеводного комплекса растительного сырья, равномерное распределение температуры и концентраций биокатализатора, что способствует более полному гидролизу полисахаридов (клетчатки, гемицеллюлоз) с образованием простых сахаров в гидролизате. Поэтапное введение ферментов также обеспечивает более высокую конверсию углеводного комплекса.

Объединение двух белковых фракций – твердого остатка и изолята, образующегося после ферментализации – может привести к повышению общего азота в смеси и изменению аминокислотного профиля кормового продукта из люпина. Эта смесь по-прежнему будет содержать в себе сахара, образованные в результате ферментативного гидролиза. Предварительную обработку следует вести без последующего отделения твердой и жидкой фракции, а по окончании ферментативного гидролиза смесь необходимо нагреть до осаждения растворенной фракции белков. Таким образом, итоговый продукт будет содержать твердую фракцию – твердый остаток с нерастворимыми протеинами и пониженным содержанием полисахаридов и жиров и осажденный изолят растворимых белков, и жидкую фракцию – раствор сахаров, аминокислот и жирных кислот.

Такой состав продукта обеспечивается выбранной предварительной обработкой №3, отсутствием стадии центрифугирования. То есть все сухие вещества после ферментативного гидролиза должны оставаться в твердом продукте. Не исключено, что концентрация белка в готовом продукте будет сильно отличаться от начальной концентрации в люпине, однако, некоторые деструктурированные белковые фракции и растворенные белки, а также простые углеводы должны стать питательной средой для культивирования микробного белка на такой среде.

Поскольку целевой функцией готового белкового продукта из люпина является сырой протеин – наиболее эффективным режимом на данном этапе является: предварительное удаление крахмала в присутствии амилазы (0,5 ч, $t=54^{\circ}\text{C}$ в буфере с $\text{pH}=5$, дозировка Белазим ХА альфа-амилаза - 0,2% от массы субстрата; далее 0,5 ч $t=54^{\circ}\text{C}$ $\text{pH}=4,5$, расчетная дозировка Эльзим ГА жидкая глюкоамилаза (3500) - 0,1% от массы субстрата), затем ферментативный гидролиз по следующей схеме – первые 6 часов при ферментной композиции R цф : R гф : R жф (0,005:3,0:0,06), $t=55^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5,5$, последующие 2 часа при ферментной композиции R цф : R гф : R жф (0,4:3,0:0,4), $t=50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5,0$, нагрев содержимого до $80-85^{\circ}\text{C}$, охлаждение.

По результатам исследования установлено, что во время ферментативной обработки белкового растительного сырья в гидролизат переходит большое количество растворимых белков. Если на таких гидролизатах в дальнейшем культивировать микроорганизмы они в первую очередь будут потреблять источники азота (аминокислоты, низкомолекулярные пептиды) и во вторую очередь источники углеводов – сахара и продукты гидролиза полисахаридов. В связи с чем доступных к быстрому усваиванию микроорганизмами аминокислот в гидролизате должно быть меньше, чтобы основным питанием микроорганизмов были простые сахара – продукты ферментативного гидролиза полисахаридов. С этой целью целесообразно осажждать растворенные белки после ферментативного гидролиза в более высокомолекулярные комплексы, и оставлять этот осадок в твердом продукте в качестве источника протеина в готовой кормовой добавке, а для питания микроорганизмов использовать сахара, полученные после поэтапного ферментативного гидролиза, и дополнительно введенные минеральные среды для их роста. К тому же осажденные белки могут иметь другой аминокислотный состав в отличие от нерастворенных, оставшихся в твердом продукте после гидролиза, что позволит балансировать аминокислотный состав итогового кормового продукта. Дрожжи, выращенные на углеводных гидролизатах, также могут иметь иной аминокислотный состав и в итоге готовый продукт повышают общее содержание сырого протеина.

По вышеуказанной схеме осуществляли культивирование кормовых дрожжей на продуктах ферментативного гидролиза, что позволило получить концентрированную высокобелковую кормовую композицию (рис. 7, а) с содержанием сырого протеина $47,2 \pm 1,12\%$ а.с.в. в случае культивирования *Candida tropicalis*, и $44,9 \pm 1,33\%$ а.с.в. в случае культивирования *Saccharomyces cerevisiae*.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Например, белковый препарат на основе люпина, полученный с применением трипсина содержал 45% белка [14].

Высокое содержание сырого протеина в нашем конечном продукте (около 45–47%), полученном, путем совмещенного ферментативного гидролиза и культивирования кормовых дрожжей также подтверждает, что люпин может служить эффективной альтернативой традиционным источникам кормового белка. Известно, что замена продуктов из сои на люпин в рационах животных не снижает их продуктивности [3], что подчёркивает практическую значимость разработанной технологии.

Микроскопическое исследование субстратов с выращенными на них дрожжами показало, что клетки *S.cerevisiae* (рис. 7, б) круглые или яйцевидные, эллипсоидные, прорастающие почкованием, 5–10 мкм в диаметре, частицы субстрата плотные, клетки дрожжей и агломератов субстрата распределены неравномерно. У *C. Tropicalis* (рис. 7, в) - клетки также с формой от круглой до овальной, размером приблизительно от 2 до 10 мкм, субстрат более пористый, клетки биомассы более равномерно распределены в композиции.

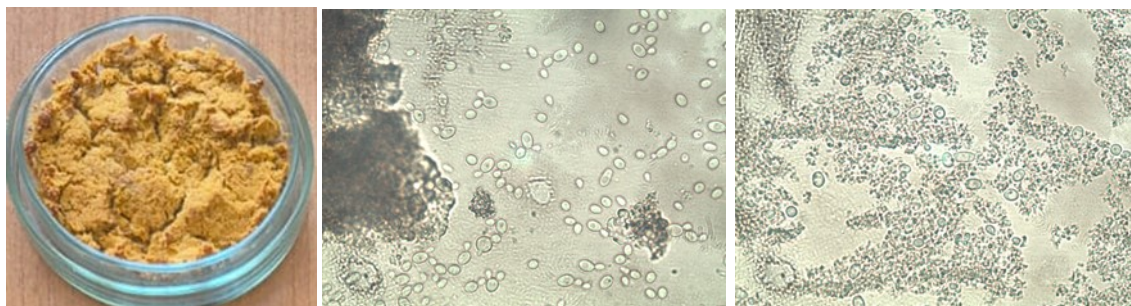


Рис. 7 - Высокобелковая кормовая композиция: а) после совмещенного процесса ферментативного гидролиза-культивирования и сушки; б) с *Saccharomyces cerevisiae* (увеличение $\times 450$), в) с *Candida tropicalis* (увеличение $\times 450$)

По отработанным режимным параметрам процесс воспроизвели на лабораторном биореакторе (рис. 8) объемом 5 л (с использованием дрожжей *Candida tropicalis*) с получением лабораторных композиций, концентрированных высокобелковых кормовых добавок на основе концентратов

растительного протеина и кормового микробного белка. Для реактора 5 л культуры *Candida tropicalis* предварительно выращивали из технически чистых культур в колбе на питательной среде Ридера, после чего засевали в смесь после ферментативного гидролиза люпина.

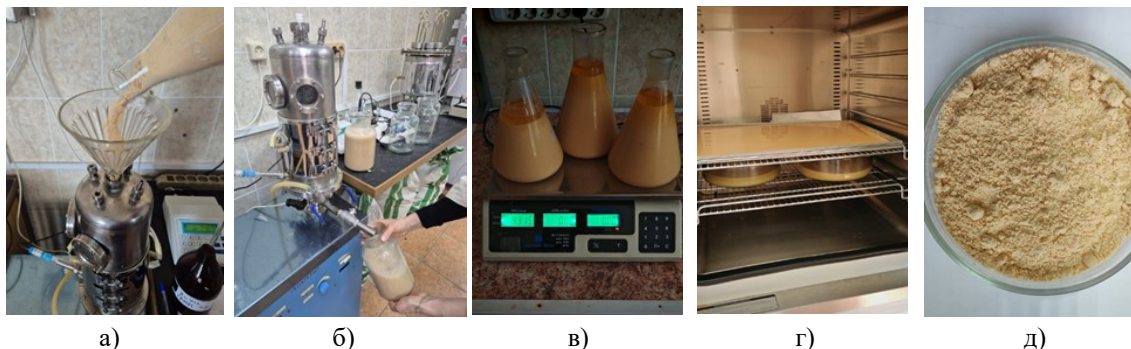


Рис. 8 – Получение белкового концентрата на лабораторном биореакторе объемом 5 л: а) загрузка реактора, б) выгрузка продукта после совмещенного процесса ферментативного гидролиза и культивирования дрожжей *Candida tropicalis*, в) отстаивание, г) сушка, д) готовый измельченный высокобелковый продукт

По органолептическим свойствам продукт имеет цвет от светло- до темно-коричневого, с выраженным запахом хлеба и дрожжей. Токсикологические исследования полученных композиций в соответствии с ГОСТ 31674-2012 показали, что продукт не токсичен. Содержание сырого протеина в продукте составило 46,2%, что на 8,6% выше, чем в исходном сырье, что дает основание рассматривать возможность использования данного высокобелкового продукта в качестве источника протеина в кормлении сельскохозяйственных

животных и птицы. Дальнейшая работа будет посвящена изучению аминокислотного состава полученного продукта, сравнения его с аналогами (соя, соевый шрот), разработке и расчету рецептур полнорационных комбикормов с использованием полученных концентрированных высокобелковых кормовых добавок, а также разработка технологии применения полнорационных комбикормов, включающих разработанные высокобелковые композиции, в животноводстве с проведением масштабных зоотехнических испытаний.

Таким образом, в ходе исследования разработаны режимы ферментативной обработки семян люпина, обеспечивающие глубокую деградацию углеводного комплекса и высвобождение простых сахаров. Предварительная обработка сырья амилолитическими ферментами значительно повысила степень растворения белков люпина, и в комбинации с последующим культивированием дрожжей это позволило обогатить продукт микробным белком. В результате получен высокобелковый кормовой продукт с повышенным содержанием сырого протеина, что подтверждает эффективность предложенной биотехнологии переработки люпина и открывает перспективы использования люпина в качестве альтернативного источника кормового протеина.

Выводы. В результате проведенной работы разработана технология ферментативной конверсии семян люпина в высокобелковый кормовой продукт. Установлен состав мультиферментной композиции и режим гидролиза, обеспечивающие максимальный выход редуцирующих сахаров (~2,23% на 6-м часу процесса). Показано, что предварительная обработка сырья амилолитическими ферментами повышает растворимость белков и позволяет получить протеиновый изолят с содержанием сырого протеина до 84,4%. Совмещенный процесс ферментативного гидролиза углеводов и культивирования дрожжей повысил общий выход протеина: полученный кормовой продукт отличается высоким уровнем сырого протеина. Проведенные токсикологические испытания (по ГОСТ 31674–2012) подтвердили отсутствие токсичности продукта, что позволяет рекомендовать его в качестве безопасной концентрированной кормовой добавки.

Полученный в ходе работы концентрат сохранил $47,2 \pm 1,12\%$ сырого протеина (при

ферментации с участием дрожжей *Candida tropicalis*) и $44,9 \pm 1,33\%$ (с *Saccharomyces cerevisiae*), что демонстрирует высокую эффективность разработанной технологии по обогащению продукта протеином.

Таким образом, поставленная цель исследования была полностью достигнута. Разработанная технология обладает существенным практическим значением для агропромышленного комплекса: использование люпина в качестве источника кормового белка может позволить частично заменить соевые продукты в рационах, снижая дефицит протеина и зависимость отрасли от импортного соевого шрота. На текущем этапе исследования себестоимость 1 тонны высокобелковой кормовой добавки из люпина составляет 39,756 тыс. руб. Стоимость и качество получаемой высокобелковой кормовой добавки сопоставимы с соевым шротом, являющимся на сегодняшний день одним из основных белковых источников в животноводстве.

Перспективы дальнейших исследований связаны с изучением аминокислотного профиля полученного протеинового продукта и сравнением его питательной ценности с традиционными соевыми концентратами. Кроме того, необходимо разработать рецептуры полнорационных комбикормов с включением полученного концентрата и провести масштабные испытания его эффективности в рационах сельскохозяйственных животных и птицы.

Сведения о финансировании. Работа выполнена за счет предоставленного в 2024 году Академией наук Республики Татарстан гранта на осуществление фундаментальных и прикладных научных работ в научных и образовательных организациях, предприятиях и организациях реального сектора экономики Республики Татарстан.

Литература

1. Optimal Enzymatic Hydrolysis of Sweet Lupine Protein Towards Food Ingredients / D. Pasarin, V. Lavric, C. E. Enascuta, et al. // Fermentation. 2023. Vol. 9. Iss. 3. P. 203. doi: 10.3390/fermentation9030203.
2. Rationale for the Choice of Enzyme Complex for Biocatalytic Treatment of Black Chokeberry Cake / G. S. Volkova, E. N. Sokolova, V. V. Ionov, et al. // Proc. 2023 Intern. Conf. on Agricultural Engineering and Technologies. 2023. P. 23–25. URL: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20230213738> (дата обращения 27.11.2025). doi: 10.52653/PPI.2023.5.5.006.
3. Fedorova Z. N. Protein Concentrates Based on Extruded Lupine Grain, With Use of Enzymes, in Feeding Calves and Poultry // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Bristol-UK: IOP Publishing, 2021. Vol. 663. No. 1. Art. no. 012021. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44857577>. (дата обращения 27.11.2025). doi: 10.1088/1755-1315/663/1/012021.
4. Khorsandi A. The Use of Solid-State Fermentation to Improve the Protein Quality, Functionality and Flavour of Pulse Protein Isolates. Dissertation. University of Saskatchewan, Canada, 2022.
5. Impact of Supercritical CO₂ Treatment on Lupin Flour and Lupin Protein Isolates / R. Domínguez-Valencia, R. Bermúdez, M. Pateiro, et al. // Foods. 2025. Vol. 14. Iss. 4. P. 675. doi: 10.3390/foods14040675.
6. Optimization of an Artificial Cellulase Cocktail for High-Solids Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials with Different Pretreatment Methods / J. Du, J. Liang, X. Gao, et al. // Bioresource Technology. 2020. Vol. 295. P. 122272. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122272.
7. Kim I. J., Lee H. J., Kim K. H. Pure Enzyme Cocktails Tailored for Saccharification of Sugarcane Bagasse Pretreated Using Different Methods // Process Biochemistry. 2017. Vol. 57. P. 167–174. doi: 10.1016/j.procbio.2017.04.006.
8. Mironova G. F., Skiba E. A., Kukhlenko A. A. Preparing Nutrient Media From Lignocellulose: Optimizing the Composition of a Multienzyme Compound // Catalysis in Industry. 2020. Vol. 12. P. 162–168. doi: 10.1134/S2070050420020063.
9. Fedorova Z. N., Tkachenko Yu. G., Bliadze V. G. Grain of Narrow-Leaved Lupine with Inclusion of Organic Micronutrient Complex OMC as an Alternative to Soybeans in Protein Concentrates // IOP Conference Series:

Earth and Environmental Science. Bristol-UK: IOP Publishing, 2021. Vol. 901. No. 1. P. 012022. URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/901/1/012022/meta> (дата обращения 27.11.2025). doi: 10.1088/1755-1315/901/1/012022.

10. Dent T., Maleky F. Pulse Protein Processing: The Effect of Processing Choices and Enzymatic Hydrolysis on Ingredient Functionality // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2023. Vol. 63. Iss. 29. P. 9914–9925. doi: 10.1080/10408398.2022.2070723.

11. Wang M., Ettelaie R., Sarkar A. Enzymatic hydrolysis of legume proteins: Lessons on surface property outcomes // Current Opinion in Food Science. 2025. Vol. 62. P. 101259. doi: 10.1016/j.cofs.2024.101259/

12. Effect of Enzymatic Hydrolysis on Solubility and Emulsifying Properties of Lupin Proteins (*Lupinus luteus*) / M. Opazo-Navarrete, C. Burgos-Díaz, K. A. Garrido-Miranda, et al. // Colloids and Interfaces. 2022. Vol. 6. Iss. 4. P. 82. doi: 10.3390/colloids6040082.

13. Production of Herbal Protein Isolates with the Enzymatic Hydrolysis Technology / K. Leonid, D. Anna, T. Sergey, et al. // Int J Pharm Res Allied Sci. 2020. Vol. 9. Iss. 3. P. 10–15.

14. Kebede Y. S., Teferra T. F. Isoelectric Point Isolation and Characterization of Proteins from Lupine Cultivars As Influenced by Chemical and Thermal Treatments // Heliyon. 2023. Vol. 9. Iss. 3. P.14027. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14027.

15. Effect of Solid-State Fermentation on Plant-Sourced Proteins: A Review / X. Feng, K. Ng, S. Ajlouni, et al. // Food Reviews International. 2024. Vol. 40. Iss. 9. P. 2580–2617. doi: 10.1080/87559129.2023.2274490.

16. Fungal Solid-State Fermentation of Crops and Their By-Products to Obtain Protein Resources: The Next Frontier of Food Industry / J. Wang, Z. Huang, Q. Jiang, et al. // Trends in Food Science & Technology. 2023. Vol. 138. P. 628–644. doi: 10.1016/j.tifs.2023.06.020.

17. Modulation of the Nutritional Value of Lupine Wholemeal and Protein Isolates Using Submerged and Solid-State Fermentation with *Pediococcus pentosaceus* Strains / E. Bartkiene, V. Sakiene, V. Bartkevics, et al. // International Journal of Food Science and Technology. 2018. Vol. 53. Iss. 8. P. 1896–1905. doi: 10.1111/ijfs.13775.

18. Fermentation of Lupin Protein Hydrolysates—Effects on Their Functional Properties, Sensory Profile and Allergenic Potential of Major Lupin Allergen *Lup An 1* / K. Schlegel, N. Lidzba, E. Ueberham, et al. // Foods. 2021. Vol. 10. Iss. 2. P. 281. doi: 10.3390/foods10020281.

19. Ферментативный гидролиз сельскохозяйственных растительных материалов с последующим культивированием кормовых дрожжей *Candida tropicalis* и *Saccharomyces cerevisiae* / Д.Б. Просвириков, Д.В. Тунцев, Р.Т. Валеева и др. // Аграрная наука. 2025. Т. 9. С. 141–150. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-398-09-141-150>.

20. Understanding Phenolic Acids Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase and Influence of Reaction Conditions / A. Aleixandre, J.V. Gil, J. Sineiro, et al. // Food Chemistry. 2022. Vol. 372. P.131231. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131231.

21. Recent Advances in Understanding the Effects of Lignin Structural Characteristics on Enzymatic Hydrolysis / Y. Yuan, B. Jiang, H. Chen, et al. // Biotechnology for Biofuels. 2021. Vol. 14. P. 1. doi: 10.1186/s13068-021-02054-1.

Сведения об авторах:

Просвириков Дмитрий Богданович – доктор технических наук, профессор, главный научный сотрудник кафедры химической кибернетики, e-mail: prosvirnikov_dmi@mail.ru

Тунцев Денис Владимирович – доктор технических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, заведующий кафедрой химической кибернетики, e-mail: tuncev_d@mail.ru

Гайнулина Мунира Кабировна – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры химической кибернетики, e-mail: gainullinamun@yandex.ru

Якимов Олег Алексеевич – доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник кафедры химической кибернетики, e-mail: nikita.korolev.1984@mail.ru

Касанова Надия Радиковна - кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, старший научный сотрудник кафедры химической кибернетики, e-mail: nadia-kasanova@mail.ru

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия.

TECHNOLOGY FOR PRODUCING A HIGH-PROTEIN FEED PRODUCT FROM LUPINE

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

Abstract. The aim of this study was to develop a technology for producing a high-protein feed product from white lupine, followed by an assessment of its protein content. Dega white lupine (Ivanovo, Russia, 2024 harvest) was used in this study. The seeds were crushed, subjected to various pre-treatment regimes, and then to enzymatic hydrolysis with preparations of Ferment Group of Companies (Belarus) at $t = 50^{\circ}\text{C}$, 130 min⁻¹, pH = 4.5–5.0 for 10 hours. The enzyme composition that allowed obtaining the maximum yield of reducing substances was determined experimentally using a complete three-factor design (factor X1 is the dosage of the cellulase complex, 0.005–0.4% of the substrate in the raw material, X2 is the dosage of hemicellulases, 0.33–3.0%, X3 is the dosage of lipase, 0.06–0.4%, response Y1 is the concentration of reducing substances in % in hydrolysates). *Candida tropicalis* VKPM Y-3 and *Saccharomyces cerevisiae* VKPM Y-1136 yeasts were cultured in a mixture of solid products and hydrolysates at 28–35°C, 90 min⁻¹, and pH 4.8–5.0 for 24 hours. After drying, the final fermented product was ground and its crude protein content was determined. The resulting concentrate contained $47.2 \pm 1.12\%$ crude protein (during fermentation with *Candida tropicalis* yeast) and $44.9 \pm 1.33\%$ (with *Saccharomyces cerevisiae*), demonstrating the high efficiency of developed technology for enriching the product with protein. This is the first technology for two-stage bioconversion of lupine seeds in the liquid phase using the “enzymatic hydrolysis - yeast cultivation” scheme, ensuring targeted hydrolysis of polysaccharides while preserving protein fractions.

Key words: lupine, protein concentrate, multi-enzyme composition, technology, enzymatic hydrolysis, microbial feed protein, yeast, protein isolate, feed production.

References

1. Pasarin D, Lavric V, Enascuta CE. Optimal enzymatic hydrolysis of sweet lupine protein towards food ingredients. Fermentation. 2023; Vol.9. Issue 3. p. 203. doi: 10.3390/fermentation9030203.

2. Volkova GS, Sokolova EN, Ionov VV. Rationale for the choice of enzyme complex for biocatalytic treatment of black chokeberry cake. [Internet]. Proc. 2023 Intern. Conf. on Agricultural Engineering and Technologies. 2023; 23-25 p. [cited 2025, November 27]. Available from: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20230213738>. doi: 10.52653/PPI.2023.5.5.006.
3. Fedorova ZN. Protein concentrates based on extruded lupine grain, with use of enzymes, in feeding calves and poultry. [Internet]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Bristol-UK: IOP Publishing. 2021; Vol.663. No.1. Art.no. 012021. [cited 2025, November 27]. Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=44857577>. (дата обращения 27.11.2025). doi: 10.1088/1755-1315/663/1/012021.
4. Khorsandi A. The use of solid-state fermentation to improve the protein quality, functionality and flavour of pulse protein isolates. Dissertation. University of Saskatchewan, Canada, 2022.
5. Dominguez-Valencia R, Bermudez R, Pateiro M. Impact of supercritical CO₂ treatment on lupin flour and lupin protein isolates. Foods. 2025; Vol.14. Issue 4. p. 675. doi: 10.3390/foods14040675.
6. Du J, Liang J, Gao X. Optimization of an artificial cellulase cocktail for high-solids enzymatic hydrolysis of cellulosic materials with different pretreatment methods. Bioresource Technology. 2020; Vol.295. 122272 p. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122272.
7. Kim IJ, Lee H, Kim KH. Pure enzyme cocktails tailored for saccharification of sugarcane bagasse pretreated using different methods. Process Biochemistry. 2017; Vol.57. 167-174 p. doi: 10.1016/j.procbio.2017.04.006.
8. Mironova GF, Skiba EA, Kukhlenko AA. Preparing nutrient media from lignocellulose: optimizing the composition of a multienzyme compound. Catalysis in industry. 2020; Vol.12. 162-168 p. doi: 10.1134/S2070050420020063.
9. Fedorova ZN, Tkachenko YuG, Bliadze VG. Grain of narrow-leaved lupine with inclusion of organic micronutrient complex OMC as an alternative to soybeans in protein concentrates. [Internet]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Bristol-UK: IOP Publishing. 2021; Vol.901. No.1. 012022 p. [cited 2025, November 27]. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/901/1/012022/meta>. doi: 10.1088/1755-1315/901/1/012022.
10. Dent T, Maleky F. Pulse protein processing: the effect of processing choices and enzymatic hydrolysis on ingredient functionality. Critical reviews in food science and nutrition. 2023; Vol.63. Issue 29. 9914-9925 p. doi: 10.1080/10408398.2022.2070723.
11. Wang M, Ettelaie R, Sarkar A. Enzymatic hydrolysis of legume proteins: Lessons on surface property outcomes. Current opinion in food science. 2025; Vol.62. 101259 p. doi: 10.1016/j.cofs.2024.101259/
12. Opazo-Navarrete M, Burgos-Diaz C, Garrido-Miranda KA. Effect of enzymatic hydrolysis on solubility and emulsifying properties of lupin proteins (*Lupinus luteus*). Colloids and Interfaces. 2022; Vol.6. Issue 4. 82 p. doi: 10.3390/colloids6040082.
13. Leonid K, Anna D, Sergey T. Production of herbal protein isolates with the enzymatic hydrolysis technology. Int J Pharm Res Allied Sci. 2020; Vol.9. Issue 3. 10-15 p.
14. Kebede YS, Teferra TF. Isoelectric point isolation and characterization of proteins from lupine cultivars as influenced by chemical and thermal treatments. Heliyon. 2023; Vol.9. Issue 3. 14027 p. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e14027.
15. Feng X, Ng K, Ajlouni S. Effect of solid-state fermentation on plant-sourced proteins: a review. Food Reviews International. 2024; Vol.40. Issue 9. 2580-2617 p. doi: 10.1080/87559129.2023.2274490.
16. Wang J, Huang Z, Jiang Q. Fungal solid-state fermentation of crops and their by-products to obtain protein resources: the next frontier of food industry. Trends in Food Science & Technology. 2023; Vol.138. 628-644 p. doi: 10.1016/j.tifs.2023.06.020.
17. Bartkiene E, Sakiene V, Bartkevics V. Modulation of the nutritional value of lupine wholemeal and protein isolates using submerged and solid-state fermentation with *Pediococcus pentosaceus* strains. International Journal of Food Science and Technology. 2018; Vol.53. Issue 8. 1896-1905 p. doi: 10.1111/ijfs.13775.
18. Schlegel K, Lidzba N, Ueberham E. Fermentation of lupin protein hydrolysates – effects on their functional properties, sensory profile and allergenic potential of major lupin allergen lup an 1. Foods. 2021; Vol.10. Issue 2. 281 p. doi: 10.3390/foods10020281.
19. Prosvirnikov DB, Tuntsev DV, Valeeva RT. [Enzymatic hydrolysis of agricultural plant materials with subsequent cultivation of fodder yeasts *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*]. Agrarnaya nauka. 2025; Vol.9. 141-150 p. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2025-398-09-141-150>.
20. Aleixandre A, Gil JV, Sineiro J. Understanding phenolic acids inhibition of α -amylase and α -glucosidase and influence of reaction conditions. Food Chemistry. 2022; Vol.372. 131231 p. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131231.
21. Yuan Y, Jiang B, Chen H. Recent advances in understanding the effects of lignin structural characteristics on enzymatic hydrolysis. Biotechnology for Biofuels. 2021; Vol.14. 1 p. doi: 10.1186/s13068-021-02054-1.

Authors:

Prosvirnikov Dmitriy Bogdanovich – Doctor of Technical Sciences, Professor, chief researcher of Chemical Cybernetics Department, e-mail: prosvirnikov_dmi@mail.ru
 Tuntsev Denis Vladimirovich – Doctor of Technical Sciences, Professor, leading researcher, Head of Chemical Cybernetics Department, e-mail: tuncev_d@mail.ru
 Gaynullina Munira Kabirovna – Doctor of Agricultural Sciences, Professor, leading researcher of Chemical Cybernetics Department, e-mail: gainullinamun@yandex.ru
 Yakimov Oleg Alekseevich – Doctor of Biological Sciences, Professor, senior researcher of Chemical Cybernetics Department, e-mail: nikita.korolev.1984@mail.ru
 Kasanova Nadiya Radikovna – Ph.D. of Agricultural Sciences, Associate Professor, senior researcher of Chemical Cybernetics Department, e-mail: nadia-kasanova@mail.ru
 Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia.