

УДК 664.2.032.663.05

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ БИОКОНВЕРСИЕЙ ГОРОХОВОЙ И НУТОВОЙ СЫВОРОТКИ*

© Р.В. Уланова¹, В.В. Колпакова^{2**}, Д.С. Куликов², В.А. Гулакова², Л.В. Васильева¹,
Ю.Ю. Берестовская¹, А.А. Ашихмин³

¹ Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ
Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Ленинский пр., 33/2,
Москва, 119071 (Россия)

² Всероссийский научно-исследовательский институт крахмала и
переработки крахмалсодержащего сырья – филиал ФИЦ картофеля им.
А.Г. Лорха, ул. Некрасова 11, Красково, Московская область, 140051
(Россия), e-mail: val-kolpakova@rambler.ru

³ Институт фундаментальных проблем биологии, ФИЦ Пущинский
научный центр биологических исследований РАН, Институтская ул., 2,
Пущино, 142290 (Россия)

В работе исследован химический состав препаратов, полученных биоконверсией каротиноидными дрожжами *Rhodotorula mucilaginosa* гороховой и нутовой сыворотки – вторичного продукта переработки муки на пищевой белковый концентрат. В процессе роста дрожжи усваивали углеводные, азотистые компоненты и обеспечивали химический состав биопрепаратов, позволяющий отнести их к высшей группе кормовых дрожжей. Химический состав сухой биомассы из сыворотки включал: общий белок (Nx6.25) – 58.90–61.29%, жир – 1.20–2.31%, зольные элементы – 3.53–4.53%, растворимые и нерастворимые волокна – 9.33–10.35% и 22.52–26.04%, соответственно. Биологическая эффективность липидов установлена на основании исследования жирнокислотного состава липидов: соотношение насыщенные : моноеновые : полиеновые жирные кислоты характеризовалось преобладанием ненасыщенных кислот – 17 : 62 : 18 у горохового препарата и 18 : 33 : 45 – у нутового. У горохового препарата в 2.4 раза больше содержалось ω-6 линолевой кислоты, у нутового – в 2.5 раза больше олеиновой кислоты. Биологическая эффективность липидов подтверждена и хроматографическим анализом состава каротиноидных компонентов, который представлен фитоином, торуленом, β-каротином, торулародином и фитоином. В нутовом биопреparate отсутствовал фитоин, но в большем количестве (в 2.8 раза) присутствовал β-каротин. Биологическая ценность биопрепаратов при урожайности 0.50–0.54 г/100 см³ подтверждена суммой незаменимых аминокислот и их скором (114–278% для горохового и 120–242% для нутового биопрепаратов). Для обоих препаратов установлено отсутствие токсичности в опытах с инфузорией *Tetrahymena pyriformis*, в присутствии которых наблюдался ее активный рост. С гороховым препаратом коэффициент роста на 29.1% был выше, чем на дистиллированной воде, с нутовым препаратом – выше на 18.6%. В организме животных биологически полноценный белок с незаменимыми аминокислотами, липидами и каротиноидами в составе горохового и нутового препаратов будут активно участвовать в обмене веществ не только как энергетические материалы, но и как биологически активные компоненты при синтезе гормонов, витаминов и других жизненно важных соединений.

Ключевые слова: горох, нут, сыворотка, биоконверсия, биопрепарат, аминокислотный состав, жирнокислотный состав, каротиноидный состав.

Сокращения: СВ – сухие вещества, БК – белковый концентрат, БП – биопрепарат, НАК – незаменимые аминокислоты, ФП – ферментные препараты, ЖС – жидкая сыворотка, ЖКС – жирнокислотный состав, АК – аминокислоты, НМС – низкоминерализованная среда

Введение

Уланова Рузалия Владимировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: colodovnicova@rambler.ru

В современных условиях глобальных климатических изменений и истощения сельскохозяйственных природных ресурсов остро стоит про-

Окончание на С. 280.

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20230211966s

** Автор, с которым следует вести переписку.

блема обеспечения населения полноценными пищевыми и кормовыми продуктами. По прогнозам экспертов, к 2050 году численность населения земли достигнет 10 млрд и производство продуктов необходимо увеличить более чем на 60%. При этом предполагается, что в зависимости от социально-экономического развития и путей производства, возможна замена 10–19% растительного и животного белка микробным протеином. В перспективе это должно привести к снижению потерь азота с пахотных земель и выбросов парниковых газов [1, 2]. Микробный одноклеточный белок может служить полноценной заменой традиционных пищевых и кормовых продуктов [3, 4]. Для масштабного производства микробной биомассы с целью снижения себестоимости в качестве основы питательных субстратов целесообразно использовать отходы пищевых производств [5, 6]. Ферментацию с микроорганизмами-продуцентами проводят на основе твердых отходов, жидких стоков, экстрактов, сыворотки, высвобождающихся при переработке зерновых и зернобобовых культур, картофеля, молока. Так, осуществлена микробиологическая переработка сыворотки, образующейся после удаления казеина, с получением продуктов для различных сегментов пищевой и фармацевтической промышленности [7–10]. С помощью микробной конвертации сточных вод производства крахмала тремя видами и шестью штаммами *Aspergillus* и *Rhizopus* получена биомасса с 7.5–49.8% белка [11]. Ферментация сточных вод, остающихся после извлечения крахмала из тапиоки, культурами *Spirulina platensis* и *Streptomyces tritici* также позволила получить продукты с 68.0–69.56% белка, 23% углеводов, 11% липидов [12–14]. Культивирование *Umbelopsis isabellina* на субстратах, составленных из отходов бобовых и злаковых, обеспечила получение биопродуктов с повышенным содержанием различных полиненасыщенных жирных кислот и каротиноидных пигментов [15]. Таким образом, анализ данных показал, что микробиологическую ферментацию отходов и вторичных продуктов переработки сырья пищевой и перерабатывающей промышленности можно отнести к наиболее целесообразным и экологически обоснованным приемом их утилизации.

Цель данной работы – сравнительная характеристика химического состава биопрепаратов, полученных биконверсией нутовой и гороховой сыворотки, остающейся после выделения из муки пищевых белковых препаратов, с каротиноидными дрожжами *Rhodotorula mucilaginosa*.

Экспериментальная часть

Материалы и методы. Объектом исследования служили препараты, полученные из гороховой и нутовой сыворотки, образующейся при получении белковых концентратов (БК) из муки. Белки и сыворотку получали из экстракта, приготовленного из муки с ферментными препаратами (ФП) от компании «Novozymes» (Дания) по схеме, указанной в работе [16]. Массовая доля СВ в гороховой сыворотке – $3.50 \pm 0.31\%$, нутовой – $2.65 \pm 0.21\%$, азотистые вещества (Nx6.25), % на СВ – 28.35% и 33.07%, белки (по Лоури) – 11.06 ± 0.23 и $13.50 \pm 3.23\%$, зола – 3.25 ± 1 соответственно. В гороховой сыворотке преобладали мальтоза (в 3 раза), раффиноза, стахиоза – в 1.4 раза, глюкоза – 3 раза, но в более чем 3 раза в ней было меньше фруктозы, галактозы, ксилозы.

Микробным объектом служил штамм дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* 111 из коллекции Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН (Москва). Чистая культура штамма *R. mucilaginosa* 111 выделена из водного образца озера Унтерсее Антарктида и идентифицирована после проведения генетического анализа 18S рНК. Для обогащения образца клетками бактерий в олиготрофных условиях к образцу воды в соотношении 4 : 1 добавляли НМС с дрожжевым экстрактом, триптоном, казаминовыми кислотами и пеп-

Колпакова Валентина Васильевна – доктор технических наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая отделом, e-mail: val-kolpakova@rambler.ru

Куликов Денис Сергеевич – научный сотрудник, e-mail: denismalah@mail.ru

Гулакова Валентина Андреевна – научный сотрудник, e-mail: vniik@arrisp.ru

Васильева Лина Васильевна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: lvasilyeva@mail.ru

Берестовская Юлия Юрьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, e-mail: jberestovskaja@mail.ru

Ашихмин Александр Александрович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: ashikhminaa@gmail.com

тоном, каждый при концентрации 0.001%. Обогащенный клетками образец получали через 1 месяц при температуре 4 °С. Культуру высевали на агаризованную среду. На средах образовывались круглые выпуклые маслянистые колонии дрожжей с гладкой поверхностью ярко-розового цвета.

Приготовление питательной среды. Для биоконверсии сыворотки корректировали ее рН и стерилизовали 15 мин при 0.5 атм. Музейные культуры с сусл-агара пересевали в пробирку с сывороткой, культивировали 24 ч, после чего пересе-

вали в колбы емкостью 300 см³ с 50 см³ питательной среды. Культуру выращивали на качалке в течение 48 ч при скорости вращения 150 мин⁻¹ и температуре 17±1 °С. Суспензию инактивировали при 95±5 °С 10–15 мин, охлаждали до 22±2 °С и центрифугировали при 4000 мин⁻¹ в течение 10 мин. Биомассу высушивали на лиофильной установке Hochvacuum HVDTG-50 (Германия) в вакууме при -80 °С и получали биопрепарат (БП). Количество биомассы определяли гравиметрическим методом: 10 см³ биомассы центрифугировали 10 мин при 5000 мин⁻¹, осадок дважды промывали стерильной дистиллированной водой и взвешивали. Результаты рассчитывали в г/100 см³ питательной среды.

Анализ продуктов. Количество общего белка, золы в сыворотке и БП определяли по ГОСТ 20083-74, массовую долю влаги, количество живых клеток и общую бактериальную обсемененность – ГОСТ 24104-2001, жира – ГОСТ 29033-91, растворимых и нерастворимых волокон – по методике, изложенной в работе [17]. Растворимые волокна осаждали четырьмя объемами 95% (v/v) этанола в течение 2 ч при 4 °С, после чего промывали 2 раза 95% этанолом. Количество сухой массы определяли гравиметрическим методом. При расчете аминокислотного сора БК использовали шкалу эталонного белка ФАО/ВОЗ (2011 г.) [18].

Углеводный состав сыворотки исследовали на газовом хроматографе модели GCMS-QP 2010 (Япония, Shimadzu Corporation) с колонкой ReproGel Na HPLC (9 µm, 8×300 mm), *аминокислотный состав* (АС) – на хроматографе модели L-8800 фирмы «Hitachi» (Япония) в режиме анализа белковых гидролизатов с сульфированным сополимером стирола с дивинилбензолом и ступенчатым градиентом натрий-цитратного буферного раствора с возрастающим значением pH и молярности (ГОСТ 32195-2013).

Жирнокислотный состав. Липиды из БП выделяли по методу Фолча. После упаривания в ротационном испарителе добавляли хлороформ, солянокислый метанол (SupelcoMethanolic-HCl 0.5 N), смесь нагревали 1 ч при 90 °С. Жирнокислотный состав исследовали на хроматографе с масс-детектором Simadzu GCMS-QP2010 Ultra при температуре 120 °С, инжектора – 200 °С; интерфейса – 205 °С, детектора – 200 °С на колонке SLB-IL82 (30 m, 0.20 µm, d = 0.25 mm) с гелевым носителем при скорости потока 35.6 см/сек и его делении 1 : 10. Градиентный режим изменяли от 120 до 260 °С со скоростью 5 °С/мин в течение 2 мин.

Состав каротиноидов. Для определения состава каротиноидов клетки биомассы разрушали, после чего из них экстрагировали пигменты, которые разделяли ВЭЖХ-анализом. Для этого 150 мкл биомассы и стеклянные бусы размером 425–650 мкм (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1 : 1 (V/V) помещали в пробирку Эппендорфа, интенсивно перемешивали 5 раз по 15 сек, после чего клетки в течение 2 мин охлаждали во льду. К разрушенным клеткам добавляли 1 см³ ацетон-метанольной смеси (7 : 2, v/v), перемешивали в шейкере и помещали на 10 мин в термостат при 45 °С. Пробу центрифугировали 1 мин на центрифуге Minispin (Eppendorf, США) при 2000 мин⁻¹. Процедуру экстракции повторяли до появления серого цвета у продукта. Экстракты пигментов объединяли, добавляли петролейный эфир и высушивали в стеклянном пузырьке под струей аргона. Анализ состава каротиноидов проводили с помощью ВЭЖХ на установке Shimadzu (Shimadzu, Япония) [19] с колонкой Agilent Zorbax SB-C18 5 µm 4.6 × 250 мм («Agilent», США). Концентрацию каротиноидов в моль% рассчитывали по коэффициентам экстинкции [20] и по среднему максимуму поглощения экстракта при 453 нм с использованием спектрофотометра Cary 50 («Agilent Technology», США). В качестве коэффициента поглощения использовали усредненный коэффициент для торулародина, торурена и β-каротина в петролейном эфире, равный 2624 [21]. Молярные коэффициенты экстинкции для производных фитоина – 50 mM⁻¹cm⁻¹, окрашенных каротиноидов – 132 mM⁻¹cm⁻¹. Все реактивы были химически чистые.

Для определения коэффициента роста инфузорий и экологической безопасности КК использовали инфузорию *Tetrahymena pyriformis* WH14 из коллекции Всероссийского НИИ ветеринарной санитарии и экологии (Москва). К 10±0.001 мг образца добавляли 10 см³ дистиллированной воды и встряхивали в течение 20 мин. Раствор разводили в 10 раз, отбирали 10 см³ и определяли коэффициент роста числа клеток инфузорий на образцах через 24 ч. Контролем служила дистиллированная вода, подсчет живых тест-организмов проводили на приборе БиоЛаТ (ООО «Европолитест», Россия) [22] по программе с использованием изображения лунок планшета с инфузориями. Программная обработка изображения основана на вычитании двух последовательных кадров лунки с тест-организмами и сканировании результирующего изображения для выявления объектов, отличающихся по яркости от фона. Коэффициент роста K_{роста} (%) вычисляли по формуле:

$$K_{\text{роста}} = \frac{A_{\text{оп}}}{A_{\text{к}}} \times 100,$$

где $A_{\text{оп}}$ – прирост клеток инфузории в опыте, $A_{\text{к}}$ – прирост клеток в контроле. При уменьшении прироста клеток инфузории на 50% и более, по сравнению с контролем, проба считалась токсичной.

Экспериментальные данные обрабатывали в программах Mathematica 10.3 и Statistica 10. Для определения доверительного интервала среднего арифметического результата 3–5 повторностей использовали критерий Стьюдента на уровне значимости $p = 0.05$.

Результаты и обсуждение

Горох (*Pisum sativum*) и нут (*Cicer arietinum*) из семейства бобовых (*Fabaceae*) являются важнейшими источниками растительного белка, содержание которого в них, в зависимости от генотипа и фенотипа, достигает 20–34%, сумма НАК аминокислот для гороха составляет 30.43–35.92%, для нута – 38.51–41.53%, от общего белка. Бобовые культуры богаты лизином, но бедны цистеином и метионином [23, 24], но в целом они более сбалансированы по составу, чем другие культуры [25]. Нами разработаны биотехнологические способы получения белковых концентратов (БК) из гороховой и нутовой муки, предусматривающие использование ФП [16]. После экстрагирования и выделения белков высвобождался побочный продукт – жидкая сыворотка (ЖС), из 1 т муки которой образуется $8 \cdot 10^3$ – $12 \cdot 10^3$ т. Гидролитические ФП гидролизуют в сырье крахмальные и некрахмальные полисахариды, а частично и белки, с образованием в сыворотке пентоз, гексоз, аминокислот и других форм растворимого азота, благоприятных для усвоения их микроорганизмами. Известно, что экстракты бобовых обладают и антиоксидантной и антиканцерогенной активностью [26–28]. Таким образом, ЖС имела химический состав с биопотенциалом, позволившем использовать питательную среду для БП без дополнительных компонентов. Несмотря на благоприятный состав, сыворотка пока не имеет практического применения из-за сложности перевозки и быстрого закисания. Исследования процессов ее переработки практически отсутствуют.

В работе нами использован штамм дрожжей *Rhodotorula mucilaginosa* 111 со способностью усваивать углеводсодержащие питательные среды. В нутовой сыворотке преобладали галактоза, ксилоза, фруктоза, три-, тетрасахариды, в гороховой – мальтоза (в 3 раза), раффиноза, стахиоза (в 1.4 раза), глюкоза (в 3 раза), но в более, чем 3 раза меньше фруктозы, галактозы, ксилозы (табл. 1).

Различия в углеводном составе сыворотки обеспечивали и различия в составе готовых концентратов (табл. 2).

Более высокое содержание азотистых веществ, ксилозы и галактозы способствовали и большей массовой доле белка в биомассе. Изучение динамики роста дрожжей на нутовой и гороховой сыворотке показало, что гороховая сыворотка обеспечивала урожайность больше в 1.1–2.2 раза, наибольший пророст биомассы на обеих средах отмечен к 72 ч роста (рис. 1) и составлял он 0.50–54 г/100 см³.

Из данных химического состава сухой биомассы (табл. 2) видно, что по массовой доле сырого протеина и зольности биомасса из обоих видов сыворотки относилась к концентратам – высшей группе кормовых дрожжей (ГОСТ 20083-74). Биомасса содержала также жир, растворимые и нерастворимые волокна полисахаридной природы. В составе микробного белка идентифицировано 18 аминокислот, спектр аминокислот полноценный, среди них 8 незаменимых и 2 условно заменимых АК (гистидин, аргинин) (рис. 2). Белок препарата, полученного из нутовой сыворотки, отличался более высокой суммой НАК: 27.00 против 21.86% на СВ. Количество треонина и валина в нем было больше в 1.4 раза, изолейцина – в 1.7 раза, лейцина и цистина – в 1.2–1.4 раза. В то же время в препарате из гороховой сыворотки содержалось в 1.9 раза больше триптофана. Различия в массовой доле НАК отразились и на значениях скор (табл. 3), однако все значения указывали на высокую биологическую полноценность обоих видов препаратов, в том числе и по значениям скор серосодержащих АК, которым бедно исходное зерно этих культур.

Жирнокислотный состав (ЖКС) липидов БП отличался по составу и количеству составляющих компонентов. У БП из гороховой сыворотки он включал 18 компонентов, из нутовой сыворотки – 11 (табл. 4). У последнего БП отсутствовали ароматические вещества и кислоты с атомами углерода C₁₁–C₁₃.

Сумма насыщенных жирных кислот (ЖК) у БП была практически одинаковая (17.15% и 17.75%), сумма ненасыщенных ЖК у нутового БП – 82.42%, у горохового – 78.14%. У нутового БП соотношение насыщенные : моноеновые : полиеновые ЖК равнялось 17 : 62 : 18 у горохового 18 : 33 : 45. У горохового БП в 2.4 раза больше содержалось линолевой кислоты, у нутового – в 2.5 раза больше олеиновой кислоты.

ЖКС горохового БП приравнивался к составу ЖК арахиса, томатов, кунжута, оливкового рафинированного масла, у нутового БП – масла мякоти оливы.

Розово-оранжевый цвет препаратов (рис. 1 электронного приложения) свидетельствовал о присутствии в них окрашенных пигментов. Спектрофотометрический анализ экстрактов из биомассы дрожжей позволил получить спектры поглощения каротиноидов в петролейном эфире (рис. 2 электронного приложения), а ВЭЖХ-анализ – хроматограммы пигментов (рис. 3 электронного приложения) с различными максимумами поглощения (табл. 5). В БП обнаружены фитоин и его производные, торулен, β -каротин, торулародин и фитоин. Известно, что первым продуктом биосинтеза каротиноидов в растениях является фитоин [29], который через ряд реакций превращается в окрашенный β -каротин, γ -каротин [30], торулин и торулародин [31]. Провитаминная активность каротиноидов горохового БП убывала в порядке: производные фитоина > торулен > β -каротин > торулародин > фитоин, у нутового БП – производные фитоина > β -каротин > торулародин > торулен. В нутовом БП сумма производных фитоина – 91.5%, против 93.7% в гороховом БП, в нем не обнаружено фитоина, но количество β -каротина больше в 2.8 раза. Эти различия могут объяснить более яркий цвет нутового БП, по сравнению с гороховым БП. Таким образом, биологически полноценный белок, НАК, липиды и каротиноиды БП в организме животных могут принимать активное участие в обмене веществ не только как энергетический материал, но и как компоненты, включающиеся в синтез гормонов, витаминов и других биологически активных соединений.

Таблица 1. Химический состав гороховой и нутовой сыворотки

Массовая доля, %	Массовая доля, % на СВ		Углеводный состав, % от общего количества						
	Азотистые вещества (Nx6.25)	Истинный белок	ВМС	Раффиноза, стахиоза	Сахароза	Мальтоза	Глюкоза	Ксилоза, галактоза	Арабиноза, фруктоза
Гороховая сыворотка									
3.5±0.14	28.35±0.43	11.06±0.23	32.0±0.4	26.4±0.4	7.4±7.1	9.7±1.1	12.1±0.91	4.9±0.61	32.0±1.2
Нутовая сыворотка									
2.65±0.43	33.07±0.63	13.50±3.23	29.7±0.4	17.6±1.2	0.0	4.7±2.3	2.3±1.2	39.1±1.6	6.5±0.2

Таблица 2. Химический состав гороховой и нутовой биомассы

Массовая доля влаги, %	Массовая доля, % на СВ				
	Белок (Nx6.25)	Жир	Зола	Волокна	
				Растворимые	Нерастворимые
Гороховая биомасса					
6.76±0.11	58.90±1.03	1.20±0.06	4.53±0.23	9.33±0.46	26.04±0.26
Нутовая биомасса					
5.36±0.21	61.29±1.05	2.31±0.07	3.53±0.33	10.35±0.26	22.52±0.06

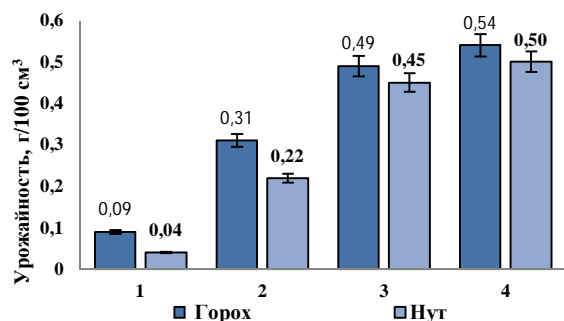


Рис. 1. Динамика роста дрожжей *R. mucilaginosa III* на нутовой и гороховой сыворотке.

Продолжительность роста, часы: 1 – 3; 2 – 24; 3 – 48; 4 – 72

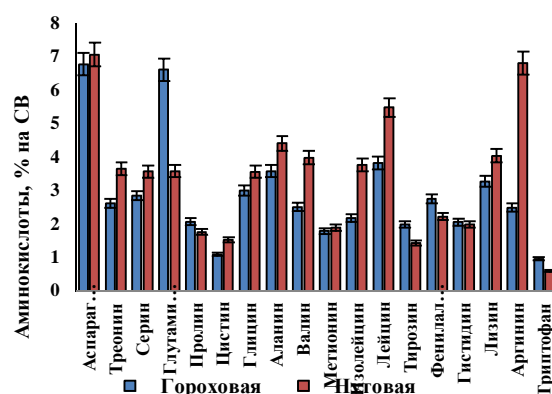


Рис. 2. Аминокислотный состав биопрепаратов из нутовой и гороховой сыворотки

Таблица 3. Аминокислотный состав биопрепаратов из гороховой и нутовой сыворотки

Аминокислотный скор, %								
Val	His	Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Thr	Trp	Phe+Tyr
Гороховый биопрепарат								
120	246	114	120	130	240	201	278	222
Нутовый биопрепарат								
162	200	203	145	120	242	147	146	143

Таблица 4. Состав жирных кислот биопрепаратов из гороховой и нутовой сыворотки

№ п/п	Жирные кислоты	К сумме кислот, %	
		Биопрепарат	
		Нутовый	Гороховый
1	Диметилтерефталат C ₁₀ H ₁₂ O ₄	0.42±0.07	–
2	1,1-диметоксинонан C ₁₁ H ₂₄ O ₂	–	0.10±0.05
3	Октандиовая кислота C ₈ H ₁₄ O ₄ (Субериновая кислота)	–	0.06±0.02
4	Декановая кислота C _{10:0} (Каприловая кислота)	–	0.25±0.10
5	Додекановая кислота C _{12:0} (Лауриновая кислота)	–	1.56±0.45
6	Дифенолкетон (C ₆ H ₅) ₂ CO	–	0.07±0.03
7	Нонаналь диметил ацеталь C ₁₃ H ₁₆ O ₂	–	0.07±0.03
8	Тетрадекановая кислота C _{14:0} (Миристиновая кислота)	0.40±0.05	0.98±0.26
9	Пентадекановая кислота C _{15:0}	0.41±0.03	1.62±0.30
10	Гептилбензоат C ₁₃ H ₁₈ O ₂	–	1.03±0.18
11	9-Гексадеценная кислота C _{16:1(9)} (Пальмитолеиновая кислота)	4.32±0.80	6.46±0.31
12	11-Гексадеценная кислота C _{16:1(11)}	0.68±0.04	–
13	Гексадекановая кислота C _{16:0} (Пальмитиновая кислота)	13.83±0.90	13.70±0.81
14	10-Гептадеценная кислота C _{17:1(10)}	1.21±0.30	1.50±0.12
15	Гептадекановая кислота C _{17:0} (Маргариновая кислота)	0.62±0.07	0.39±0.09
16	2-Гидроксигексадекановая кислота C ₁₆ H ₃₂ O ₃	–	0.63±0.07
17	9,12-Октадекадиеновая кислота C _{18:2(9,12)} (Линоленовая кислота)	17.63±0.11	45.26±0.10
18	9-Октадеценная кислота C _{18:1(9)} (Олеиновая кислота)	58.58±0.85	24.04±0.76
19	6-октадеценная кислота C _{18:1(6)} (Петроселиновая кислота)	–	0.88±0.22
20	Октадекановая кислота C _{18:0} (Стеариновая кислота)	1.89±0.07	1.41±0.21

Таблица 5. Каротиноидный состав биопрепаратов

№	Каротиноиды	Время удержания с колонки, мин		Абсорбция макс., нм		Мол.%	
		1	2	1	2	1	2
1	Производное фитоина	20.241	20.182	272, 281, 293	271, 281, 292	90.6	86.3
2	Торулардин	22.224	21.403	470, 491, 527	468, 493, 526	1.0	1.5
3	Неидентифицированный каротиноид	–	31.626	–	458, 482, 512	–	1.7
4	Торулен	32.340	31.870	458, 487, 519	462, 489, 520	3.4	1.6
5	β-Каротин	35.213	34.782	429, 452, 479	429, 452, 476	1.3	3.7
6	Производное фитоина	–	38.117	–	282, 293	–	0.5
7	Производное фитоина	–	38.932	–	271, 282, 292	–	1.4
8	Фитоин	39.240	–	270, 282, 293	–	0.7	–
9	Производное фитоина	–	39.752	–	271, 282, 293	–	3.3
9	Производное фитоина	40.038	–	271, 282, 293	–	3.1	–

Примечание: биопрепараты: 1 – гороховый; 2 – нутовый.

Биотестирование с биологическими моделями из одноклеточной инфузории *Tetrahymena pyriformis* показало, что БП стимулировали рост микроорганизма. Коэффициент роста с гороховым препаратом на 29.1% был выше, чем на дистиллированной воде, с нутовым БП – выше на 18.6%. Следовательно, оба стимулировали рост инфузории, что указывало на отсутствие биологической токсичности исследуемых БП.

Заключение

Установлена возможность биоконверсии компонентов сыворотки, образующейся при переработке нутовой и гороховой муки на белковый концентрат, с дрожжами *Rhodotorula mucilaginosa* 111. Химический состав сухой биомассы (БП), полученных из обоих видов сыворотки: общий белок (Nx6.25) – 58.90–61.29%, жир 1.20–2.31%, зольность – 3.53–4.53%, растворимые и нерастворимые волокна – 9.33–10.35% и 22.52–26.04% соответственно.

Биологическая ценность биопрепаратов, полученных при урожайности 0.50–0.54 г/100 см³ в течение 4 суток роста, обусловлена высокой суммой НАК и их скором: 114–278% – для горохового БП и 120–242% – для нутового БП. Липиды биологически эффективны с преобладанием ненасыщенных ЖК при соотношении насыщенные : моноеновые : полиеновые кислоты для горохового БП 17 : 62 : 18 и 18 : 33 : 45 – для нутового. У горохового БП в 2.4 раза больше содержалось ω -6 линолевой кислоты, у нутового – в 2.5 раза больше олеиновой кислоты.

Провитаминная активность каротиноидов горохового БП убывала в следующем порядке: производные фитоина > торулен > β -каротин > торулародин > фитоин, у нутового БП – производные фитоина > β -каротин > торулен. В нутовом биопрепарате отсутствовал фитоин, но в большем количестве (в 2.8 раза) присутствовал β -каротин.

БП не проявляли токсичность в опытах с инфузорией *Tetrahymena pyriformis* при коэффициенте роста выше на 29.1% у горохового и 18.6% – у нутового, чем на дистиллированной воде.

Биологически полноценный белок, липиды и каротиноиды в составе обоих видов БП в организме животных будут оказывать положительное воздействие на обмен гормонов, витаминов и других жизненно важных соединений, а биоконверсия сыворотки позволит снизить нежелательную нагрузку на биосферу и расширить ассортимент кормовых добавок.

Список литературы

1. Pikaar I., Matassa S., Bodirsky B.L., Weindl I., Humpenoder F., Rabaey K., Boon N., Bruschi M., Yuan Z., van Zanten H., Herrero M, Verstraete W., Popp A. Decoupling livestock from land use through industrial feed production pathways // *Environmental Science & Technology*. 2018. Vol. 52. N13. Pp. 7351–7359. DOI: 10.1021/acs.est.8b00216.
2. Ciani M., Lippolis A., Fava F., Rodolfi L., Niccolai A., Tredici M.R. Microbes: Food for the Future // *Foods*. 2021. Vol. 10. N5. P. 971. DOI: 10.3390/foods10050971.
3. Nyssölä A., Suhonen A., Ritala A., Oksman-Caldentey K.M. The role of single cell protein in cellular agriculture // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2022. Vol. 75. 102686. DOI: 10.1016/j.copbio.2022.102686.
4. Humpenöder F., Bodirsky B.L., Weindl I., Lotze-Campen H., Linder T., Popp A. Projected environmental benefits of replacing beef with microbial protein // *Nature*. 2022. Vol. 605. Pp. 90–96. DOI: 10.1038/s41586-022-04629-w.
5. Vethathirri R.S., Santillana E., Wuertz S. Microbial community-based protein production from wastewater for animal feed applications // *Bioresource Technology*. 2021. Vol. 341. 25723. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125723.
6. Javourez U., O'Donohue M., Hamelin L. Waste-to-nutrition: a review of current and emerging conversion pathways // *Biotechnology Advances*. 2021. Vol. 53. 107857. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107857.
7. Zott T., Solieri L., Iacumin L., Picozzi C., Gullo M. Valorization of cheese whey using microbial fermentations // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020. Vol. 104. Pp. 2749–2764. DOI: 10.1007/s00253-020-10408-2.
8. Barba F.J. An integrated approach for the valorization of cheese whey // *Foods*. 2021. Vol. 10. N3. P. 564. DOI: 10.3390/foods10030564.
9. Schultz N., Chang L., Hauck A., Reuss M., Sylatak C. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006. Vol. 69. N5. Pp. 515–520. DOI: 10.1007/s00253-005-0012-z.
10. Yadav J.S.S., Yan S., Pilli S., Kumar L., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. Cheese whey: a potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides // *Biotechnology Advances*. 2015. Vol. 33. N6. Pp. 756–774. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.002.
11. Jin B., van Leeuwen J., Yu Q., Patel B. Screening and selection of microfungi for microbial biomass protein production and water reclamation from starch processing wastewater // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 1999. Vol. 74. N2. Pp. 106–110. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4660(199902)74:2<106.
12. Phang S.M., Miah M.S., Yeoh B.G., Hashim M.A. Spirulina cultivation in digested sago starch factory wastewater // *Journal of Applied Physiology*. 2000. Vol. 12. Pp. 395–400. DOI: 10.1023/A:1008157731731.
13. Awg-Adeni D.S., Abd-Aziz S., Bujang K., Hassan M.A. Bioconversion of sago residue into value added products // *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9. N14. Pp. 2016–2021. DOI: 10.5897/AJB10.009.
14. Türker M., Mert Selimoğlu S., Taşpınar-Demir H. Waste(water) to feed protein effluent characteristics, protein recovery, and single-cell protein production from food industry waste streams // *Clean Energy and Resource Recovery: Wastewater Treatment Plants as Biorefineries*. 2022. Pp. 201–243. DOI: 10.1016/B978-0-323-90178-9.00017-2.
15. Slaný O., Klempová T., Marcinčák S., Čertík M. Production of high-value bioproducts enriched with γ -linolenic acid and β -carotene by filamentous fungi. *Umbelopsis isabellina* using solid-state fermentations // *Annals of Microbiology*. 2020. Vol. 70. Article 5. DOI: 10.1186/s13213-020-01545-0.
16. Куликов Д.С., Колпакова В.В., Уланова Р.В., Чумикина Л.В., Бессонов В.В. Биологическая переработка зерна гороха с получением пищевых и кормовых белковых концентратов // *Биотехнология*. 2020. Т. 36. №4. С. 49–58. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-49-58.
17. Кочеткова А.А., Траубенберг С.Е., Нечаев А.П. и др. Пищевая химия: лабораторный практикум: пособие для вузов. СПб., 2006. 304 с.

18. Leser S. The 2013 FAO report on dietary protein quality evaluation in human nutrition: Recommendations and implications // *Nutrition Bulletin*. 2013. Vol. 38. N4. Pp. 421–428. DOI: 10.1111/nbu.12063.
19. Ashikhmin A., Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Incorporation of spheroidene and spheroidenone into light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017. Vol. 170. Pp. 99–107.
20. Lopes N.A., Remedi R.D., Dos Santos S.C., Burkert C.A.V., de Medeiros Burkert J.F. Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodibolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa* // *Food Science and Biotechnology*. 2017. Vol. 26. N3. Pp. 759–766. DOI: 10.1007/s10068-017-0098-y.
21. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. UV/visible spectroscopy. In *Carotenoids – Spectroscopy*. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995. Vol. 1b. Pp. 47–62.
22. Черемных Е.Г., Кулешин А.В., Кулешина О.Н. Биотестирование пищевых добавок на инфузориях // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности*. 2011. №3. С. 5–12.
23. Sarwar G., Peace R.W. Comparisons between true digestibility of total nitrogen and limiting amino acids in vegetable proteins fed to rats // *Journal of Nutrition*. 1986. Vol. 116. N7. Pp. 1172–1184. DOI: 10.1093/jn/116.7.1172.
24. Голубева Л.В., Кириллова Л.Г., Корниенко Т.С., Жуланова Т.С. Изучение физико-химических свойств нута для создания новых молочных продуктов // *Хранение и переработка сельхозсырья*. 2008. №7. С. 71–72.
25. Вишнякова М.А., Бурляева М.О., Булынец С.В., Сеферова И.В., Плеханова Е.С., Нуждин С.В. Местные сорта нута из центров происхождения культуры: разнообразие и различие // *Сельскохозяйственная биология*. 2017. Т. 52. №7. С. 976–985. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.976rus.
26. Zhao Y., Du S.-k., Wang H., Cai M. In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes // *Food Chemistry*. 2014. Vol. 152. Pp. 462–466. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.006.
27. Singh B., Singh J.P., Kaur A., Singh N. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: a review // *Food Research International*. 2017. Vol. 101. Pp. 1–16.
28. Roleira F.M., Tavares-da-Silva E.J., Varela C.L., Costa S.C., Silva T., Garrido J., Borges F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties // *Food Chemistry*. 2015. Vol. 183. Pp. 235–258. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.039.
29. Latha B.V., Jeevaratnam K., Murali H.S., Manja K.S. Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source // *Indian Journal of Biotechnology*. 2005. Vol. 4. Pp. 353–357.
30. Kot A.M., Błażej S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M. *Rhodotorula glutinis* – potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. Vol. 100. N14. Pp. 6103–6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8.
31. Goodwin T.W. Biosynthesis of Carotenoids // *The Biochemistry of the Carotenoids*. 1980. Pp. 33–76. DOI: 10.1007/978-94-009-5860-9_2.

Поступила в редакцию 7 октября 2022 г.

После переработки 24 ноября 2022 г.

Принята к публикации 19 января 2023 г.

Для цитирования: Уланова Р.В., Колпакова В.В., Куликов Д.С., Гулакова В.А., Васильева Л.В., Берестовская Ю.Ю., Ашихмин А.А. Исследование препаратов, полученных биоконверсией гороховой и нуговой сыворотки // *Химия растительного сырья*. 2023. №2. С. 279–288. DOI: 10.14258/jcrpm.20230211966.

Ulanova R.V.¹, Kolpakova V.V.^{2*}, Kulikov D.S.², Gulakova V.A.², Vasilyeva L.V.¹, Berestovskaya Yu.Yu.¹, Ashikhmin A.A.³ CHEMICAL COMPOSITION OF BIOLOGICAL PREPARATIONS OBTAINED BY BIOCONVERSION OF PEA AND CHICKPEA SERUM

¹ Institute of Microbiology. S.N. Vinogradsky, Federal Research Center "Fundamental Foundations of Biotechnology", of Russian Academy of Sciences, Leninsky pr., 33/2, Moscow, 119071 (Russia)

² All-Russian Research Institute of Starch and Processing of Starch-Containing Raw Materials – a branch of the Federal Potato Research Center named after A.G. Lorch, ul. Nekrasova, 11, Kraskovo, Moscow region, 140051 (Russia), e-mail: val-kolpakova@rambler.ru

³ Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Institutsкая ul., 2, Pushchino, 142290 (Russia)

In this work, we studied the chemical composition of preparations obtained by bioconversion of carotenoid yeast *Rhodotorula mucilaginosa* of pea and chickpea whey, a secondary product of flour processing into food protein concentrate. In the process of growth, yeast assimilate carbohydrate, nitrogenous components and provided the chemical composition of biological products, allowing them to be attributed to the highest group of fodder yeast. The chemical composition of dry biomass from whey: total protein (Nx6.25) – 58.90–61.29%, fat – 1.20–2.31%, ash elements – 3.53–4.53%, soluble and insoluble fibers – 9.33–10.35% and 22.52–26.04%, respectively. The biological effectiveness of lipids based on the study of the fatty acid composition of lipids: the ratio of saturated:monoenoic:polyenoic fatty acids is characterized by the predominance of unsaturated acids – 17 : 62 : 18 in the pea preparation and 18 : 33 : 45 in the chickpea preparation. The pea preparation contains 2.4 times more ω -6 of linoleic acid, the chickpea preparation contains 2.5 times more oleic acid. The biological effectiveness of lipids was also confirmed by chromatographic analysis of the composition of carotenoid components, which is represented by phytoin, torulene, β -carotene, torularodine and phytoin. There is no phytoin in the chickpea biological product, but β -carotene is present in a larger amount (2.8 times). The biological value of biological products with a yield of 0.50–0.54 g/100 cm³ is confirmed by the amount of essential amino acids and their rate (114–278% for pea and 120–242% for chickpea biological products). For both drugs, there is no toxicity in experiments with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, in the presence of which its active growth is observed. With a pea preparation, the growth factor is 29.1% higher than with distilled water, with a chickpea preparation it is 18.6% higher. In the body of animals, a biologically complete protein with essential amino acids, lipids and carotenoids in the composition of pea and chickpea preparations will actively participate in the metabolism not only as energy materials, but also as biologically active components in the synthesis of hormones, vitamins and other vital compounds.

Keywords: peas, chickpeas, whey, bioconversion, biopreparation, amino acid composition, fatty acid composition, carotenoid composition.

References

1. Pikaar I., Matassa S., Bodirsky B.L., Weindl I., Humpenöder F., Rabaey K., Boon N., Bruschi M., Yuan Z., van Zanten H., Herrero M., Verstraete W., Popp A. *Environmental Science & Technology*, 2018, vol. 52, no. 13, pp. 7351–7359. DOI: 10.1021/acs.est.8b00216.
2. Ciani M., Lippolis A., Fava F., Rodolfi L., Niccolai A., Tredici M.R. *Foods*, 2021, vol. 10, no. 5, p. 971. DOI: 10.3390/foods10050971.
3. Nyssölä A., Suhonen A., Ritala A., Oksman-Caldentey K.M. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2022, vol. 75, 102686. DOI: 10.1016/j.copbio.2022.102686.
4. Humpenöder F., Bodirsky B.L., Weindl I., Lotze-Campen H., Linder T., Popp A. *Nature*, 2022, vol. 605, pp. 90–96. DOI: 10.1038/s41586-022-04629-w.
5. Vethathirri R.S., Santillana E., Wuertz S. *Bioresource Technology*, 2021, vol. 341, 25723. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125723.
6. Javourez U., O'Donohue M., Hamelin L. *Biotechnology Advances*, 2021, vol. 53, 107857. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107857.
7. Zott T., Solieri L., Iacumin L., Picozzi C., Gullo M. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, vol. 104, pp. 2749–2764. DOI: 10.1007/s00253-020-10408-2.
8. Barba F.J. *Foods*, 2021, vol. 10, no. 3, p. 564. DOI: 10.3390/foods10030564.
9. Schultz N., Chang L., Hauck A., Reuss M., Syldatk C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 69, no. 5, pp. 515–520. DOI: 10.1007/s00253-005-0012-z.
10. Yadav J.S.S., Yan S., Pilli S., Kumar L., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. *Biotechnology Advances*, 2015, vol. 33, no. 6, pp. 756–774. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.07.002.
11. Jin B., van Leeuwen J., Yu Q., Patel B. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1999, vol. 74, no. 2, pp. 106–110. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4660(199902)74:2<106.
12. Phang S.M., Miah M.S., Yeoh B.G., Hashim M.A. *Journal of Applied Physiology*, 2000, vol. 12, pp. 395–400. DOI: 10.1023/A:1008157731731.
13. Awg-Adeni D.S., Abd-Aziz S., Bujang K., Hassan M.A. *African Journal of Biotechnology*, 2010, vol. 9, no. 14, pp. 2016–2021. DOI: 10.5897/AJB10.009.
14. Türker M., Mert Selimoğlu S., Taşpınar-Demir H. *Clean Energy and Resource Recovery: Wastewater Treatment Plants as Biorefineries*, 2022, pp. 201–243. DOI: 10.1016/B978-0-323-90178-9.00017-2.
15. Slaný O., Klempová T., Marcinčák S., Čertík M. *Annals of Microbiology*, 2020, vol. 70, article 5. DOI: 10.1186/s13213-020-01545-0.

* Corresponding author.

16. Kulikov D.S., Kolpakova V.V., Ulanova R.V., Chumikina L.V., Bessonov V.V. *Biotechnologiya*, 2020, vol. 36, no. 4, pp. 49–58. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-49-58. (in Russ.).
17. Kochetkova A.A., Traubenberg S.Ye., Nechayev A.P. i dr. *Pishchevaya khimiya: laboratornyy praktikum Posobiye dlya vuzov*. [Food chemistry: laboratory practice Manual for universities]. St. Petersburg, 2006, 304 p. (in Russ.).
18. Leser S. *Nutrition Bulletin*, 2013, vol. 38, no. 4, pp. 421–428. DOI: 10.1111/nbu.12063.
19. Ashikhmin A., Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017, vol. 170, pp. 99–107.
20. Lopes N.A., Remedi R.D., Dos Santos S.C., Burkert C.A.V., de Medeiros Burkert J.F. *Food Science and Biotechnology*, 2017, vol. 26, no. 3, pp. 759–766. DOI: 10.1007/s10068-017-0098-y.
21. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. *UV/visible spectroscopy. In Carotenoids – Spectroscopy*. Birkhäuser Verlag: Basel, 1995, vol. 1b, pp. 47–62.
22. Cheremnykh Ye.G., Kuleshin A.V., Kuleshina O.N. *Vestnik Rossiyskogo universiteta družby narodov. Seriya: Ekologiya i bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti*, 2011, no. 3, pp. 5–12. (in Russ.).
23. Sarwar G., Peace R.W. *Journal of Nutrition*. 1986, vol. 116, no. 7, pp. 1172–1184. DOI: 10.1093/jn/116.7.1172.
24. Golubeva L.V., Kirillova L.G., Korniyenko T.S., Zhulanova T.S. *Khraneniye i pererabotka sel'khozsy'r'ya*, 2008, no. 7, pp. 71–72. (in Russ.).
25. Vishnyakova M.A., Burlyayeva M.O., Bulyntsev S.V., Seferova I.V., Plekhanova Ye.S., Nuzhdin S.V. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*, 2017, vol. 52, no. 7, pp. 976–985. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.976rus. (in Russ.).
26. Zhao Y., Du S.-k., Wang H., Cai M. *Food Chemistry*, 2014, vol. 152, pp. 462–466. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.006.
27. Singh B., Singh J.P., Kaur A., Singh N. *Food Research International*, 2017, vol. 101, pp. 1–16.
28. Roleira F.M., Tavares-da-Silva E.J., Varela C.L., Costa S.C., Silva T., Garrido J., Borges F. *Food Chemistry*, 2015, vol. 183, pp. 235–258. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.03.039.
29. Latha B.V., Jeevaratnam K., Murali H.S., Manja K.S. *Indian Journal of Biotechnology*, 2005, vol. 4, pp. 353–357.
30. Kot A.M., Błażej S., Kurcz A., Gientka I., Kieliszek M. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, vol. 100, no. 14, pp. 6103–6117. DOI: 10.1007/s00253-016-7611-8.
31. Goodwin T.W. *The Biochemistry of the Carotenoids*, 1980, pp. 33–76. DOI: 10.1007/978-94-009-5860-9_2.

Received October 7, 2022

Revised November 24, 2022

Accepted January 19, 2023

For citing: Ulanova R.V., Kolpakova V.V., Kulikov D.S., Gulakova V.A., Vasilyeva L.V., Berestovskaya Yu.Yu., Ashikhmin A.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 2, pp. 279–288. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230211966.