

УДК 606.547.96

Биологическая переработка зерна гороха и вторичного сырья крахмального производства с получением пищевых и кормовых белковых концентратов

© 2020 Д.С. КУЛИКОВ¹, В.В. КОЛПАКОВА^{1*}, Р.В. УЛАНОВА², Л.В. ЧУМИКИНА³,
В.В. БЕССОНОВ⁴

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, дп. Красково, Московская область, 140051

² Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 117312

³ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071

⁴ ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, 109240

*e-mail: val-kolpakova@rambler.ru

Поступила в редакцию 26.03.2020 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принята к публикации 19.07.2020 г.

Цель исследования — разработка биотехнологического процесса получения белковых концентратов на основе биокаталитической и микробной конверсии гороховой муки и вторичного продукта крахмального производства — сыворотки. В работе использовали стандартные и специальные методы анализа химического и биохимического состава: аминокислотного, углеводного, фракционного — муки, сыворотки и белковых концентратов. Установлено, что гороховая мука содержала 52,28–57,05% водорастворимых азотистых веществ, 23,04–25,50% солерастворимых, 2,94–4,69% спирторастворимых, 0–0,61% растворимого глютенина, 6,67–10,40% щелочерастворимого глютенина и 5,96–10,86% нерастворимых склеротических веществ. Разработаны математическая модель и оптимальные параметры ферментативной экстракции белка гороха с выходом 65–70%. Показано, что ультразвуковое воздействие повышало выход азотистых веществ на $23,16 \pm 0,69\%$ по сравнению с контролем без ультразвука. Белковый концентрат имел массовую долю азотистых веществ $72,48 \pm 0,41\%$ (N-6,25) и полноценный аминокислотный состав. На основе микробной конверсии сыворотки, остающейся после осаждения белка с использованием культур *Saccharomyces cerevisiae* 121 и *Geotrichum candidum* 977 получены кормовые концентраты из биомассы и культуральной жидкости с массовой долей биологически полноценного белка 61,68–70,48%. Белковые концентраты положительно влияли на показатели жизнедеятельности крыс и продукты их выделения. Разработана технологическая схема комплексной переработки зерна гороха и вторичного сырья крахмального производства для апробации в опытно-промышленных условиях.

Ключевые слова: горох, белковый концентрат, экстракты, сыворотка, биоконверсия, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, химический состав, аминокислотный состав

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-49-58

Интерес к белку из зернобобовых в составе различных пищевых и кормовых продуктов обусловлен его питательной ценностью, надлежащими функциональными свойствами

и относительно низкой стоимостью [1–5]. Белковые концентраты и изоляты из гороха, в основном импортного производства, с содержанием белка до 80% сегодня применяют в производстве

Список сокращений: АК — аминокислоты; БК — белковый концентрат; КМПК — кормовой микробно-растительный концентрат; СВ — сухое вещество; ФП — ферментные препараты; УЗ — ультразвук/ультразвуковая (обработка).

хлебобулочных, макаронных изделий, имитационного молока, творога, йогурта, мясных аналогов, детского, спортивного питания, пищевых добавок и т. д. [5–11]. Однако в связи с высокой потребностью в белковых продуктах важна разработка отечественных технологий концентрированных форм растительного белка с высокой биологической и функциональной ценностью. Такие формы можно получить без применения химических реагентов, в том числе щелочи, вызывающих образование новых поперечных связей, оказывающих негативное воздействие на здоровье животных [12]. Сведений об использовании ферментных препаратов (ФП) для получения высокого выхода безопасных белков с повышенной массовой долей их в препаратах и надлежащих функциональных свойствах из зернобобовых культур недостаточно. В связи с этим разработка новых способов экстрагирования белка из гороха, без использования щелочных реагентов или с минимальным их количеством, и создание эффективных технологических схем актуальна.

Вопросы переработки традиционных зерновых культур по такому направлению практически решены для производства сухой пшеничной клейковины и этилового спирта из пшеницы, ржи, ячменя, других зерновых культур, используемых в виде смесей или по отдельности [13–15]. Большой опыт по переработке зерна накоплен в ВНИИ крахмалопродуктов при производстве крахмала из кукурузы, пшеницы, тритикале, овса, ячменя и др. с разработкой из вторичных продуктов — преимущественно кормовой продукции [16–22]. Так, установлена возможность микробиологической переработки безбелковых экстрактов и зерновой сыворотки с базидиальным грибом *Pleurotus ostreatus* 23, дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, грибом *Geotrichum candidum* 977 и с их ассоциациями с получением кормового микробно-растительного концентрата (КМРК). Массовая доля белка в КМРК колебалась от 25,2 до 80,0% на сухое вещество (СВ) [16–20]. Более высокие результаты для белковых концентратов (БК) получены на тритикалевом экстракте и гороховой муке по схеме с использованием ферментных препаратов (ФП) [20], исключающих разрушение структуры и состава белковых фракций сырья. Скор серосодержащих аминокислот (АК) белковых композитов составил 70%, остальных незаменимых АК — 100% и выше, массовая доля белка — 75–80% на СВ [21].

Согласно статистическим данным, сырьевая база зернобобовых культур в нашей стране

составляет 2,9–3,7 млн. т в год, что достаточно для производства белковых препаратов различных форм и свойств. В связи с этим назрела необходимость разработки новой технологии БК из гороха с применением его глубокой переработки, основанной на использовании ФП и ультразвуковой (УЗ) обработки сырья для извлечения белка и биологической модификации ее вторичных продуктов.

Цель работы — разработка биотехнологического процесса получения БК на основе биокаталитической и микробной конверсии гороховой муки и вторичного продукта крахмального производства — сыворотки.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы

В работе использовали:

— цельносмолотую нативную сортовую гороховую муку из зерна сорта Ямал, выращенного в Алтайском крае в 2017 году;

— товарную муку с выходом 60–70% и массовой долей, % на СВ: белок (N \cdot 6,25)* — 24,30 \pm 1,40, зола — 2,87 \pm 0,20, жир — 1,58 \pm 0,12, крахмал — 50,60 \pm 1,10, углеводы — 22,42 \pm 3,66;

— экструдированную гороховую муку от ООО «Юг России» (Россия) с массовой долей, % на СВ: белок (N \times 6,25) — 23,67, зола — 3,18, жир — 5,59, крахмал — 44,52, углеводы — 23,04.

Для выделения БК использовали следующие ФП компании фирмы Novozymes A/S (Дания):

— Shearzym 500 L с ксиланазной активностью 500 ед/г и оптимальными условиями при 65–75 °С, рН 4,5–5,5;

— Viscoferm L с целлюлолитической активностью 600 ед/г, оптимумом действия при 50–60 °С и рН 4,8–5,8;

— Fungamyl 800 L — источник α -амилазы (50–60 °С, рН 5,0–6,5);

— AMG 300 L 2500 — источник глюкоамилазы (55–60 °С, рН 4,5–5,5).

В качестве источника протеаз использовали ФП Distizym Protacid (Erbslon, Germany). Концентрацию ФП изменяли от 50 до 190 ед/г сырья, продолжительность экстракции — от 1 до 5 ч, гидромодуль — от 1:7 до 1:25 [20, 22].

Микроорганизмы были получены из коллекции Института микробиологии им. С.М. Виноградского. Филогенетическое положение нового штамма *Geotrichum candidum* 977 установлено совместно с ФГБУ ГосНИИгенетика (регистрационный № ВКПМ У-300). Музейные культуры

* Коэффициент конверсии азота в белок, коэффициент Джонса.

с сула-агара пересевали в пробирку с сывороткой, полученной после выделения белка, и культивировали 24 ч. Посевную культуру пересевали в колбы емкостью 300 см³ с 50 см³ питательной среды и выращивали на качалке при скорости вращения 150 об/мин 48 ч при температуре 27±1 °С.

Анализ белков

Массовую долю белка в БК определяли по ГОСТ 10846-91 и по методу Лоури, влаги — по ГОСТ 13586.5-93, клетчатки — по ГОСТ 13496.2-91, золы — по ГОСТ 27494-87, жира — по ГОСТ 29033-91. Углеводный состав сыворотки исследовали на газовом хроматографе Shimadzu GC MS 2010 (Shimadzu, Япония).

Фракционный состав белков определяли по методу Осборна в модификации Бушука [23]. Аминокислотный состав определяли на хроматографе модели L-8800 фирмы Hitachi (Япония) в стандартном 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). При расчете аминокислотного скорра использовали шкалу эталонного белка ФАО/ВОЗ (2011 г.). УЗ-обработку белковой суспензии проводили на аппарате Soniprep 150 ME (Mse Ltd., Великобритания).

Приготовление питательной среды

Для приготовления питательной среды использовали сыворотку с pH 6,0–6,5 и химическим составом: 1,4–2,3% СВ, азотистые соединения — 8,62–19,26% на СВ; моносахариды (мг/100 г): глюкоза — 185,7±1,2, фруктоза — 144,3±0,2, мальтоза — 270,6±2,3, мальтотриоза — 51,1±1,2, декстрины — 398,2±0,43. Сыворотку стерилизовали при давлении 0,1 МПа, в охлажденный субстрат вводили суспензию симбиотических культур в количестве 3% от общей массы и выращивали при 26–28 °С в течение 24–48 ч, перемешивая на качалке со скоростью 150 об/мин. Суспензию инактивировали при 90–100 °С в течение 10–15 мин и охлаждали 10–15 мин при температуре 22±2 °С. Биомассу от культуральной жидкости отделяли на центрифуге при 4 000 об/мин в течение 10 мин. Биомассу (КМПК-1) и микробную суспензию (КМПК-2) высушивали на лиофильной установке Hochvacuum HVD TG-50 (Veb Hochvakuum Dresden, Германия) в вакууме при –80 °С. Образцы анализировали на микроскопе Axioskop 40 FL (Carl Zeiss, Германия) при увеличении ×100 с цифровой камерой AxioCam MRe 5 (Carl Zeiss, Германия).

Анализ влияния КМПК–2 в составе корма на поведение и микрофлору фекалий крыс

Эксперименты проводили на самках крыс линии Wistar с массой тела 210–230 г в виварии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН. Животных содержали при 19–20 °С по 5 особей в клетке и ежедневно давали комбикорм для лабораторных грызунов в расчете 40–50 г на особь. Опытная группа получала в составе комбикорма 5% КМПК-2.

Фекалии животных перетирали, взвешивали, образцы массой 1 г помещали в стерильные пробирки, гомогенизировали в физиологическом растворе и разводили в соотношении 1:1–1:4. Образцы пересевали и определяли количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) на мясо-пептонном агаре, молочнокислых бактерий (МКБ) — на среде МРС (ГОСТ 10444.11-89), бактерий группы кишечных палочек (БГКП) — на среде Эндо. Микрофлору фекалий опытных и контрольных крыс исследовали перед началом кормления КМПК–2 и в конце — на 25 сутки. Посевы анализировали после 48 ч культивирования при 37 °С. Число колоний микроорганизмов выражали в КОЕ/г.

Обработка результатов

Экспериментальные данные обрабатывали в программах TableCurve 2D 5.1, TableCurve 3D 4.0, Mathematica 10.3 и Statistica 10. Доверительный интервал среднего арифметического рассчитан по уровню значимости $p = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение фракционного состава белков

Для исключения использования щелочных растворов при экстракции белков и предотвращения их деструкции в основу процесса положено использование гидролитических ФП подклассов карбогидраз и протеаз для обеспечения повышенного выхода и надлежащих функциональных свойств БК. Для выбора экстрагента исследовали фракционный состав белков нативной и экстрагированной гороховой муки, так как с изменением состава фракций белков [24] экструзия могла положительно отразиться на их выходе. Установлено, что сортовая и товарная гороховая мука содержала 52,28–57,05% водорастворимых азотистых соединений, 23,04–25,50% соле-растворимых и 2,94–4,69% спирторастворимых соединений, 0–0,61% растворимого глютенина, 6,67–10,40% щелочерастворимого глютенина и 5,96–10,86% нерастворимых склеротических веществ (табл. 1). Общая сумма растворимых

Фракционный состав азотистых и белковых веществ различных видов гороховой муки
Fractional composition of nitrogenous and protein substances of various types of pea flour

Массовая доля, % от общего количества в образце					
Растворитель					
Вода	0,5 М NaCl	70%-ный этанол	0,1 М CH ₃ COOH	0,05 н NaOH	Нерастворимые склеробелки
Сортовая мука					
Азотистые вещества (Метод Кьельдаля, N×6,25)					
57,05±0,05	23,04±0,40	2,94±0,08	0,61±0,07	10,40±0,04	5,96±1,20
Белковые вещества (метод Лоури)					
49,79±1,05	15,42±0,52	2,86 ±0,60	0,26 ±0,05	6,20 ±0,46	5,96±0,06
Товарная мука					
Азотистые вещества (Метод Кьельдаля, N×6,25)					
52,28±0,08	25,50±0,90	4,69±0,06	0	6,67±0,10	10,86±0,32
Белковые вещества (метод Лоури)					
46,78±0,10	12,53 ±0,1	2,88 ±0,75	0,11 ±0,10	5,44±0,89	10,86±1,06
Экструдированная товарная мука (N×6,25)					
Азотистые вещества (Метод Кьельдаля, N×6,25)					
25,84±0,10	10,73±1,01	2,84±0,05	0	52,70±1,0	4,91±0,06
Белковые вещества (метод Лоури)					
18,62±1,59	6,53 ±0,10	2,76 ±0,14	0,43 ±0,08	50,88±1,21	4,91±0,05

азотистых соединений в нативной муке составила 78,12–80,09% от общего количества в навеске, что могло служить основанием для использования одного раствора соли с целью перевода белков в раствор. Однако освободиться от соли трудно по различным причинам.

Экструдированная мука имела в своем составе в 2–2,5 раза меньше водо- и солерастворимых фракций и в 1,6 раза меньше спирторастворимых белков, чем нативная мука. У товарной муки после экструдирования почти в 8 раз увеличилось количество щелочерастворимых веществ, что могло сопровождаться изменениями в структуре и/или свойствах белков [12, 24]. Следовательно, для выделения белков из экструдированной муки целесообразно использовать растворы щелочи, что нежелательно в целях обеспечения безопасности продуктов. Закономерности распределения белков, определенных по методу Лоури, аналогичны закономерностям азотистых веществ: наибольшее количество белков приходилось на альбумины, глобулины, наименьшее — на проламины и растворимые глютеины. В экструдированной товарной муке также обнаружено в 10 раз больше щелочерастворимых белков, что еще раз указывало на то, что экструдированную муку целесообразно использовать для выделения белков из-за возможно более низкого их выхода.

Оптимизация технологических параметров

Для исследования технологического процесса использовали схему, разработанную нами для получения БК из вторичных продуктов переработки зерна тритикале на крахмал с поэтапным добавлением ФП, гидролизующих различные виды связей в компонентах гороховой муки [20]. Добавление ФП осуществляли с учетом оптимальных условий их действия. Установлено, что в сумме на I стадии с ФП Viscoferm и Fungamil 800 L и на II стадии с ФП Shearzym 500 и AMG 300 L, также, как и на стадии III с Distizym Protacid больше всего азотистых веществ перешло в водный раствор из сортовой гороховой муки. В этой муке содержалось меньше щелочерастворимых и нерастворимых белков. Общая сумма водорастворимых веществ (58,08%) в присутствии ФП у сортовой нативной муки выше на 32,83% и 34,76%, чем, соответственно, у товарной и экструдированной сортовой муки (табл. 2), поэтому дальнейшие исследования продолжены с сортовой гороховой мукой.

Для определения оптимальных параметров экстрагирования белков составили матрицу планирования эксперимента из 25 опытов зависимости растворимости (R) белка муки от концентрации ФП (sv), гидромодуля (gl) и продолжительности

Растворимость белков гороховой муки по стадиям процесса

The solubility of pea flour proteins in the stages of the process

Мука	Растворимость белков, % от общего количества в образце					
	Стадии процесса					
	I + II	III	IV	Сумма I+IV	Осадок	Сумма
Товарная мука	17,72±0,50	5,60±0,08	47,51±0,59	70,83±1,17	26,65±1,37	97,48±2,54
Экструдированная мука	19,75±0,31	5,50±0,08	56,86±0,27	82,11±0,66	17,08±0,29	99,19±0,95
Сорговая мука	28,90±1,01	29,2±0,09	34,75±3,02	92,83±1,01	8,12±1,08	100,9±2,02

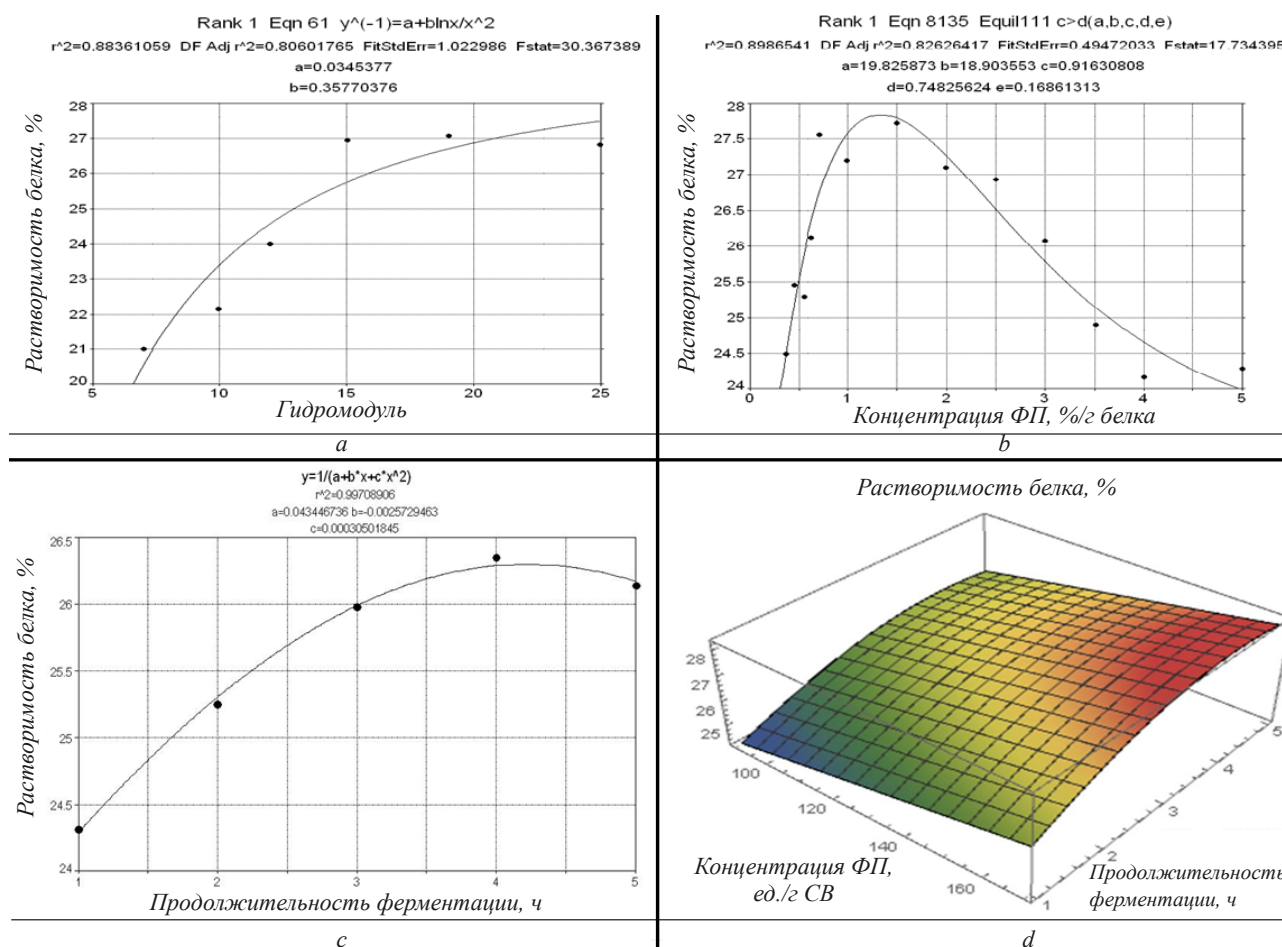


Рис. 1. Зависимость растворимости белка от гидромодуля (a), концентрации ФП (b), продолжительности ферментации (c). 3D-график зависимости растворимости белка от концентрации ФП и продолжительности ферментации (d).

Fig. 1. The dependence of protein solubility on the hydromodule (a), the concentration of enzyme preparations (b), the duration of fermentation the duration of the process (c). 3D plot of the dependence of protein solubility on the concentration of enzyme preparations and duration of fermentation (d).

экстракции на первых двух стадиях (t). Используются частные эмпирические зависимости растворимости белка от влияющих факторов в виде: $R = \alpha_0 \cdot f_1 \cdot f_2 \cdot f_3$, — где α_0 — неизвестный коэффициент, f_1, f_2, f_3 — эмпирические зависимости усредненных значений R от влияющих факторов sv, t и gl, которые находились из плана эксперимента

по методу латинских многоугольников. Данные обработаны в программе TableCurve 2D. Результаты обработки растворимости белка от факторов приведены на рис. 1.

Зависимость растворимости белка (R, %) от влияющих факторов оценивали по формуле:

$$R = \alpha_0 \cdot f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdot f_4;$$

Частные эмпирические зависимости растворимости белка имели вид:

— f_1 от концентрации ФП (sv , ед/г):

$$f_1 = 22,52 + 0,0238sv;$$

— f_2 от продолжительности обработки (t , ч):

$$f_2 = \frac{1}{0,0434 - 0,00257 \cdot t + 0,000305 \cdot t^2};$$

— f_3 от гидромодуля (gl):

$$f_3 = 26,58 - 3,215 \cdot \operatorname{erf} \left[\left(\frac{gl - 10,97}{2,1283} \right)^2 \right];$$

где erf — это функция ошибок.

$$R = \frac{-0,382105 \cdot (946,218 + sv) \cdot (-8,2675 + \operatorname{Erfc} [0,220767 \cdot (10,97 + gl)^2])}{142,295 + t \cdot (-8,42623 + t)}$$

где R — растворимость белка, %; sv — концентрация ФП, ед/г СВ; t — продолжительность ферментации, ч; gl — гидромодуль; Erfc — дополнительная функция ошибок.

После решения задачи получили оптимальные значения факторов для максимальной растворимости R белка на первых двух стадиях: sv — 170 ед/г СВ, t — 4,2 ч, gl — 15. После обработки остатка на стадии III протеолитическим ФП Distizum в течение 2 ч при рН 3,1 растворимость белка достигла $60 \pm 1\%$. Для сокращения объема жидкой части использовали одну стадию с добавлением ФП в той же последовательности, как на I–III стадиях, и при тех же условиях с одним центрифугированием для отделения общего растворенного белка от осадка. Растворимость белков составила $73,77 \pm 0,70\%$, общих азотистых веществ — $76,14 \pm 0,09\%$, против $48,69 \pm 0,65\%$ и $60,0 \pm 1,03\%$, соответственно, в предыдущем варианте с тремя стадиями при добавлении ФП по отдельности.

Ультразвуковая обработка. Исследование влияния УЗ на растворимость белков и азотистых веществ суспензии гороховой муки показало, что обработка УЗ до воздействия ФП и обработка УЗ остатка после удаления из суспензии азотистых веществ с ФП обеспечивает одинаковые результаты. Максимальный переход белка в раствор достигался при трехминутном УЗ-воздействии при амплитуде волны 10 мкм. Растворимость общих азотистых веществ, по сравнению с контролем, увеличивалась на 23,16% (рис. 2), растворимость истинного белка — на 21,42%. При всех остальных значениях времени воздействия растворимость оставалась ниже, чем при 3 мин, независимо от значений амплитуды УЗ-волны. Таким образом, УЗ-обработка суспензии гороховой муки с ФП обеспечивала растворимость азотистых веществ

Для нахождения неизвестного коэффициента α_0 использовали программу Mathematica 12, получали решение задачи определения коэффициента α_0 и график взаимосвязи расчетных и экспериментальных данных с коэффициентом корреляции 0,97 и двух-, трехмерные зависимости факторов и функции растворимости (рис. 1): гидромодуля (a), концентрации ФП (b), продолжительности ферментации (c) и 3D-график зависимости растворимости белка от концентрации ФП и продолжительности ферментации (d).

Выведено уравнение зависимости растворимости белка от технологических факторов:

на 83–84% без использования растворов щелочи. Гидролизую связи между углеродом и кислородом в клетчатке, гемицеллюлозах, крахмале и частично в белках между углеродом и азотом, ФП облегчали переход белков в раствор и повышали их выход. Белки из раствора выделяли осаждением 10%-ным раствором HCl в изоэлектрической точке 4,2 с последующим центрифугированием суспензии при 5 000 об/мин и отделением сыворотки. Осадок промывали водой, высушивали лиофильным способом и получали БК с химическим составом (в % на СВ): белок ($N \times 6,25$) — $72,48 \pm 0,41$, зола — $1,55 \pm 0,07$, жир — $4,47 \pm 0,27$, углеводы — $24,5 \pm 0,76$. Выход белков с концентратом составил 65–70% от общего содержания их в сырье.

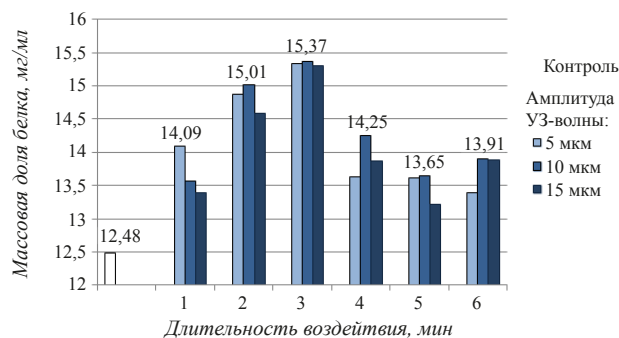


Рис. 2. Влияние длительности УЗ-обработки суспензии гороховой муки на растворимость азотистых веществ.

Fig. 2. The effect of the duration of ultrasonic treatment of a suspension of pea flour on the solubility of nitrogenous substances.

Микробиологическая переработка сыворотки в КМПК. Повышение кормовой ценности безбелковой сыворотки и трансформация ее компонентов в КМПК достигалась с помощью

Аминокислотный скор белковых продуктов

Amino acid score of protein products

Концентрат	Аминокислотный скор, %								
	Val	His	Ile	Leu	Lys	Met+Cys	Thr	Trp	Phe+Tyr
Белковый концентрат	100	133	150	130	131	100	157	196	197
КМПК из биомассы	107	219	124	107	116	226	179	247	197

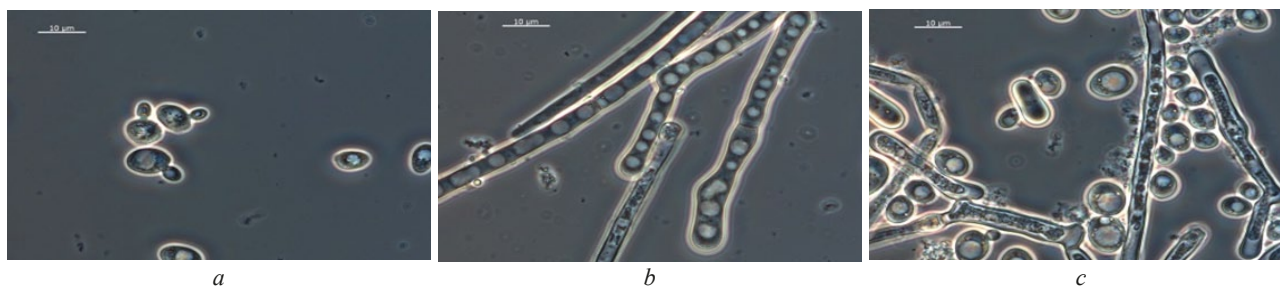


Рис. 3. Клетки монокультур и их консорциума: *S. cerevisiae* (a), *G. candidum* 977 (b), *S. cerevisiae* + *G. candidum* 977 (c).

Fig. 3. Monoculture cells and their consortium: *S. cerevisiae* (a), *G. candidum* 977 (b), *S. cerevisiae* + *G. candidum* 977 (c).

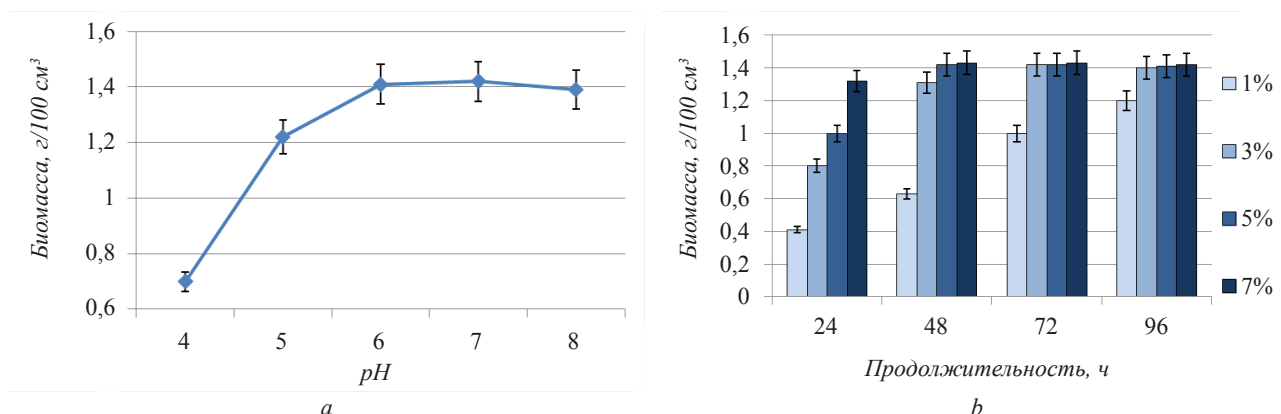


Рис. 4. Влияние кислотности среды (a) и количества посевного материала (1–7%) (b) на количество биомассы культур *G. candidum* 977 + *S. cerevisiae* 121.

Fig. 4. The effect of the acidity of the medium (a) and the amount of seed (b) on the amount of biomass of *G. candidum* 977 + *S. cerevisiae* 121.

микроорганизмов, для культивирования которых разработаны условия подготовки питательной среды и ферментации. Микроорганизмы выбирали из дрожжей родов *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Saccharomyces* и микромицетов, используемых в сыроделии: *Geotrichum*, *Penicillium*. Активно росли на сыворотке представители родов *Pichia*, *Saccharomyces*, тогда как *Rhodotorula* и *Hansenula* развивались слабо. Для исследований выбрали дрожжи *S. cerevisiae* и микромицет *G. candidum* 977. Культура *G. candidum* 977 подщелачивала субстрат в процессе роста до слабощелочных значений. *G. candidum* 977 использовали совместно с *S. cerevisiae* в соотношении 1 : 1.

Морфология клеток монокультур и смешанной культуры представлена на рис. 3.

Изучение влияние pH субстрата, температуры и количества посевного материала на образование биомассы в течение 2 сут. показало, что наиболее эффективным для роста был диапазон pH 6,0–6,5; при более низких pH (4,5–5,0) или более высоких (7,5–8,0) рост микроорганизмов замедлялся. Совместное культивирование 3% дрожжей и микромицета при температуре 26–28 °C способствовало накоплению биомассы (рис. 4) с массовой долей белка 57,90±0,51% на СВ, тогда как на отдельных культурах количество белка достигало (в % на СВ): 16,39% для *G. candidum* 977 и 50,23% для

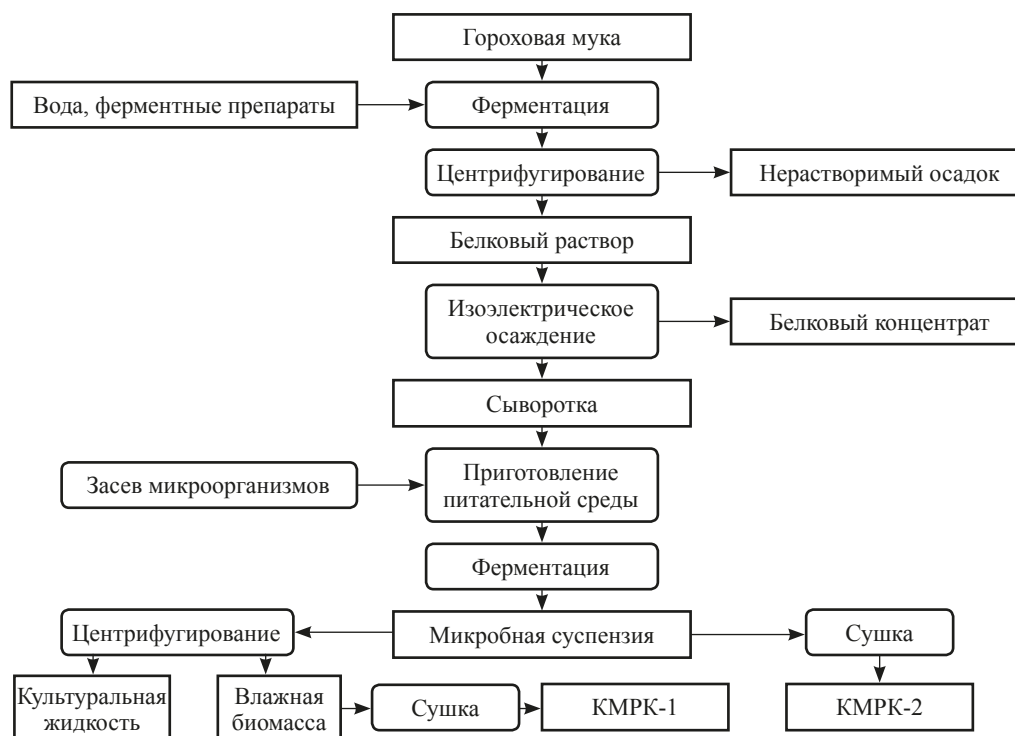


Рис. 5. Схема получения КМПК-1 и КМПК-2 микробной трансформацией сыворотки.

Fig. 5. Scheme for obtaining FMPC-1 and FMPC-2 by microbial transformation of the serum.

S. cerevisiae 121. Микробную суспензию лиофильно высушивали и получали КМПК-2, а после центрифугирования суспензии, промывки биомассы водой и высушивания — препарат КМПК-1. По органолептическим показателям концентраты представляли собой рассыпчатые порошки светло-кремового цвета без постороннего запаха. Типичный химический состав КМПК-2 из биомассы с культуральной жидкостью, % на СВ: белок (N×6,25) — 61,68±0,4, зола — 8,60±0,03, жир — 8,31±0,36, углеводы (по разнице) — 21,41±0,55. Химический состав биомассы на гороховой сыворотке (КМПК-1), % на СВ: белок (N×6,25) — 70,48±0,41, зола — 1,55±0,07, жир — 4,47±0,27, углеводы — 24,5±0,76.

БК и КМПК по аминокислотному составу полноценные, на что указывали значения скоры незаменимых АК, который рассчитывали с использованием эталонной шкалы, утвержденной FAO/ВОЗ в 2011 году (табл. 3). Скор выше или 100% имели все незаменимые АК, даже скор Met+Cys был в диапазоне 100–226%, который ранее был недостижим при использовании другого сырья.

Влияние КМПК в составе корма на поведение и микрофлору фекалий крыс. В опытах на крысах использовали КМПК-2. Степень поедания корма в течение 25 сут была одинаковой в контрольной и опытной группах. Отсутствовала разница по аппетиту, двигательной активности, реакции на внешние

раздражители, пищеварению, состоянию кожных покровов. КМАФАнМ, БГКП (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*) и МКБ в составе фекалий обеих групп животных были практически идентичными: в контрольной группе крыс на 25 день — $1,5 \cdot 10^8$, в опытной — $1,6 \cdot 10^8$, БГКП — $1,3 \cdot 10^6$ и $1,1 \cdot 10^6$, МКБ — $1,1 \cdot 10^5$ и $1,2 \cdot 10^5$ соответственно. Результаты указывали на доброкачественность, безопасность и перспективность включения КМПК-2 в состав рациона животных.

На основе полученных данных разработана комплексная схема переработки гороха на белковый концентрат пищевого и кормового назначения, предназначенная для апробации в опытно-промышленных условиях (рис. 5).

Таким образом, с применением ферментных препаратов, катализирующих гидролиз клетчатки, гемицеллюлоз, крахмала, декстринов, частично и белков, с дополнительной УЗ-обработкой промежуточных продуктов переработки гороховой муки разработан биотехнологический процесс получения пищевого биологически полноценного белкового концентрата с выходом 65–75% и массовой долей белка в нем 72,48±0,41% без использования щелочи. С помощью микробной биоконверсии вторичного продукта, остающегося после осаждения белков при получении белкового концентрата из гороховой муки (сыворотки), с совместным использованием гриба *G. candidum* 977 и дрожжей

S. cerevisiae 121 установлена возможность производства безопасного кормового микробно-растительного концентрата с массовой долей биологически полноценного белка на уровне 70,48–72,48%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Singhal A., Karaca A.C., Tyler R., et al. Pulse proteins: from processing to structure-function relationships. *Grain Legumes*, 2016, 3, 55–78. doi: 10.5772/64020
2. Pasupuleti V.K., Demain A.L. *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. 2010, ISBN:978-1-4020-6673-3, ISBN-10:1402066732.
3. Schafer C., Neidhart S., Carle R. Application and sensory evaluation of enzymatically texturised vegetable proteins in food models. *Eur. Food Res. Tech.*, 2011, 232, 1043–1056. doi: 10.1007/s00217-011-1474-0
4. Klost M., Drusch S. Structure formation and rheological properties of pea protein-based gels. *Food Hydrocolloid*, 2019, 94, 622–630. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.03.030
5. Кононова С.В., Муранова Т.А., Зинченко Д.В., Белова Н.А., Мирошников А.И. Биотехнологические подходы при использовании белков рапса и сои в кормах аквакультуры лососевых рыб. *Биотехнология*, 2016, 32(5), 57–68. doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-5-57-68
6. Shrivastava C., Chakraborty S. Bread from wheat flour partially replaced by fermented chickpea flour: optimizing the formulation and fuzzy analysis of sensory data. *Food Sci. Technol.*, 2018, 90, 215–223. doi: 10.1016/j.lwt.2017.12.019
7. Xu J.C., Zhang M.L., He T., et al. Application of delignified cellulose to enhance intracellular and extracellular lipid production from oleaginous yeast using acetic acid. *Biores. Technol.*, 2019, 293. doi: 10.1016/j.biortech.2019.12.2032
8. Sarris D., Sampani Z., Rapti A., et al. Valorization of crude glycerol, residue deriving from biodiesel-production process, with the use of wild-type new isolated *Yarrowia lipolytica* strains: production of metabolites with pharmaceutical and biotechnological interest. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2019, 20(10), 881–894. doi: 10.2174/1389201020666190211145215
9. Zhou X.L., Ouyang Z., Zhang X.L., et al. Sweet corn stalk treated with *Saccharomyces cerevisiae* alone or in combination with *Lactobacillus plantarum*: nutritional composition, fermentation traits and aerobic stability. *Animals*, 2019, 9(9), 598. doi: 10.3390/ani9090598
10. Souza Filho P.F., Nair R.B., Andersson D., Patrik R., Lennartsson P.R., Taherzadeh M.J. Vegan-mycoprotein concentrate from pea-processing industry byproduct using edible filamentous fungi. *Fungal Biol. Biotechnol.*, 2018, 5, 5–8. doi: 10.1186/s40694-018-0050-9
11. Suman G., Nupur M., Anuradha S., Pradeep B. Single cell protein production: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2015, 4(9), 251–262.
12. Нечаев А.П., Траубенберг С.Е., Кочеткова А.А. и др. *Пищевая химия*, 6-е издание. Санкт-Петербург: ГИОРД, 2015, 672 с.
13. Дубцова Г.Н., Колпакова В.В., Нечаев А.П., Крикунова Л.Н. Использование белковых продуктов из пшеницы в пищевых производствах. Москва: ЦНИИТЭИ хлебопродуктов, 1992, 42.
14. Колпакова В.В., Крикунова Л.Н., Дубовицкий Ю.Е. Дифференцированные фракции переработки зерна пшеницы на спирт новый источник пищевого белка. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2001, 6, 41–45.
15. Кононенко В.В. Крикунова Л.Н., Колпакова В.В. Белковые композиты из дифференцированных фракций зерновых культур. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2002, 11, 63–67.
16. Гольдштейн В.Г., Лукин Н.Д., Радин О. Побочные продукты крахмалопаточного производства — кормовые компоненты. *Комбикорма*, 2018, 7–8, 54–56.
17. Уланова Р.В., Гольдштейн В.Г., Колпакова В.В. и др. Изучение культивирования штамма *Pleurotus ostreatus* в глубинной культуре на среде зернового экстракта. *Достижения науки и техники АПК*, 2018, 32(8), 82–87. doi:10.24411/0235-2451-2018-10822
18. Lukin D., Kolpakova V., Goldshtein V., et al. Bioconversion of liquid wastes of starch and alcohol production. *17th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM*, 2017, 521–528. doi: 10.5593/sgem2017/61/S25.068
19. Андреев Н.Р., Колпакова В.В., Гольдштейн В.Г. К вопросу глубокой переработки зерна тритикале. *Пищевая промышленность*, 2018, 9, 30–33.
20. Андреев Н.Р., Колпакова В.В., Кравченко И.К. и др. Утилизация вторичных продуктов переработки тритикале с получением кормового микробно-растительного концентрата для прудовых рыб. *Юг России: экология, развитие*, 2017, 4, 90–104. doi: 10.18470/1992-1098-2017-4-90-1
21. Куликов Д.С., Гулакова В.А., Колпакова В.В. и др. Получение белковых концентратов и кормовой микробной биомассы из экстракта тритикале и гороховой муки с использованием ферментов. *Пищевая промышленность*, 2019, 4, 49–51.
22. Колпакова В.В., Уланова Р.В., Куликов Д.С. и др. Зерновые композиты с комплементарным аминокислотным составом для пищевых и кормовых целей. *Техника и технология пищевых производств*, 2019, 2(49), 301–311. doi: 10.21603/2074-9414-2019-2-301–311.
23. Orth R.A., Bushuk W. Studies of glutenin. I. Comparison of preparative methods. *Cereal Chemistry*, 1973, 50, 106–113.
24. Остриков А.Н., Абрамов О.В., Василенко В.Н., Вертяков Ф.Н. Процесс экструзии крахмалосодержащего сырья. В кн.: *Теоретические основы пищевых технологий*. Ред. Панфилов В.А., книга 2, Москва: Колосс, 2009, 623–648.

Biological Processing of Pea Grain and Secondary Starch Raw Materials to Produce Food and Feed Protein Concentrates

D.S. KULIKOV¹, V.V. KOLPAKOVA^{1*}, R.V. ULANOVA², L.V. CHUMIKINA³, and V.V. BESSONOV⁴

¹ All-Russian Research Institute for Starch Products, Branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems, Russian Academy of Sciences, Kraskovo, Moscow Oblast, 140051, Russia

² S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312, Russia

³ A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia

⁴ Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, 109240, Russia

*e-mail: val-kolpakova@rambler.ru

Received March 26, 2020

Revised April 15, 2020

Accepted July 19, 2020

Abstract—The goal of the study was to develop a biotechnological process for the production of protein concentrates via bioconversion of pea flour and whey, a secondary product of starch manufacture. Standard and special methods were used to analyze the chemical and biochemical composition of protein concentrates (amino acid, carbohydrate, and fractional) of flour, whey and protein concentrates. It was established that pea flour contains 52.28–57.05% water-soluble nitrogenous substances, 23.04–25.50% salt-soluble, 2.94–4.69% alcohol-soluble compounds, 0–0.61% of soluble glutenine, 6.67–10.40% alkali-soluble glutenine and 5.96–10.86% insoluble sclerotic substances. A mathematical model and optimal parameters of the enzymatic extraction of pea protein with a yield of 65–70% were developed. Ultrasonic exposure increased the yield of nitrogenous substances by $23.16 \pm 0.69\%$, compared with the control without ultrasound. The protein concentrate had a mass fraction of nitrogenous substances of $72.48 \pm 0.41\%$ (Nx6.25) and a complete amino acid composition. The microbial conversion by the *Saccharomyces cerevisiae* 121 and *Geotrichum candidum* 977 cultures of starch whey which remained after protein precipitation allowed us to obtain feed concentrates from biomass and culture liquid with a protein mass fraction of 61.68–70.48% (Nx6.25). Protein concentrates positively affected the vital signs of rats and their excretory products. A technological scheme was developed to test the complex pea grain and starch whey processing under pilot conditions.

Key words: pea, protein concentrate, extracts, whey, bioconversion, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, chemical composition, amino acid composition

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-49-58