



На правах рукописи

Базулева Виктория Александровна

**Свойства и практическое применение белково-фосфатного комплекса,
полученного из *Phaseolus vulgaris* (Kidney bean)**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре биотехнологии, химии и стандартизации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный технический университет».

Научный руководитель:

Прутенская Екатерина Анатольевна

кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственный технический университет»

Официальные оппоненты:

Серегина Инга Ивановна

доктор биологических наук, профессор кафедры агрономической, биологической химии и радиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Фоменко Иван Андреевич

кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии и технологии продуктов биоорганического синтеза Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (ФГБОУ ВО «ВГУИТ»)

Защита состоится 24 декабря 2024 г. в 11.00 на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева по адресу: 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9, ауд. 443.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева, а также на официальном сайте <http://diss.muctr.ru/>

Автореферат диссертации разослан "___" _____ 2024г.

Ученый секретарь диссертационного совета 99.0.027.03,
кандидат технических наук, профессор

 И.В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одним из важных направлений в биотехнологии является использование возобновляемых природных ресурсов, а именно растительной биомассы, для получения целевых продуктов в пищевой, фармацевтической и сельскохозяйственной промышленности. Бобовое сырье, а в частности семена фасоли содержат большое количество белковых веществ и крахмала. Белковые вещества фасоли в зависимости от метода их выделения можно использовать в разных сферах. После тепловой обработки получается белковый гидролизат, который находит свое применение как ингредиент в кормовых продуктах, суповых концентратах, как специальная добавка в макаронной, кондитерской, хлебопекарной и других отраслях в пищевой промышленности. Белки фасоли, полученные без тепловой обработки, обладают ингибиторной активностью в отношении ферментов пищеварительного тракта человека и используются в современных биологически активных добавках при ожирении (Акулов, 2010; Чурикова, 2011).

Белки фасоли получают все большее признание в связи с растущим спросом на альтернативные белки для создания аналогов мясных и молочных продуктов (Boukid, 2022). Выделение из растительного сырья белков для питания человека, животных, создания питательных сред для разработки диагностических препаратов, получение консервантов для сохранения фуражного зерна – все эти примеры имеют актуальное значение.

Существует много методов выделения белковых веществ из растительного сырья, но при этом не все позволяют сохранить функциональные свойства белков (питательную ценность, биологическую активность). Усовершенствование способов выделения, концентрирования и модификации белковых веществ как ферментных систем дает возможность для создания белковых биопрепаратов, а также возможность утилизации образующихся крахмалсодержащих отходов. Включение белковых веществ бобового происхождения в кормовые продукты для животных может значительно повлиять на увеличение питательной ценности комбикормов, благодаря высокому содержанию незаменимых аминокислот.

Цели и задачи исследования. Цель работы – получение белково-фосфатного комплекса из *Phaseolus vulgaris* (*Kidney bean*) и изучение его физико-химических и биологических свойств для определения потенциального использования в качестве консерванта фуражного зерна.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- 1) разработать способ получения белково-фосфатного комплекса из семян фасоли, обладающего ингибиторной активностью по отношению к α -амилазам
- 2) изучить влияние ультразвукового воздействия на состав и свойства получаемого белково-фосфатного комплекса;
- 3) изучить физико-химические свойства белково-фосфатного комплекса;
- 4) изучить влияние полученного белково-фосфатного комплекса на α -амилазы *Aspergillus oryzae* и панкреатическую амилазу, а также на амилазы семян фуражного зерна при проращивании;
- 5) определить потенциальную возможность использования белково-фосфатного комплекса в качестве консерванта фуражного зерна и оценить влияние

белково-фосфатного комплекса на фитопатогенную микрофлору при прорастании зерна;

б) подобрать концентрации белково-фосфатного комплекса для использования его в качестве консерванта при обработке фуражного зерна.

Научная новизна работы заключается в том, что предложен способ, позволяющий получить белково-фосфатный комплекс из семян *Phaseolus vulgaris* (*Kidney bean*). Выявлено, что ультразвуковое воздействие при экстракции белка влияет на химический состав и биологическую активность полученного белково-фосфатного комплекса. Охарактеризованы физико-химические свойства белково-фосфатного комплекса: химический состав, размеры полученных частиц, амилолитическая активность, термическая стабильность вещества. Выявлена ингибиторная активность белково-фосфатного комплекса в отношении α -амилазы *Aspergillus oryzae*, панкреатической амилазы и амилаз семян ржи. Определено влияние белково-фосфатного комплекса на всхожесть зерна ржи сорта «Дымка». Экспериментально подтверждено, что происходит подавление прорастания семян при обработке фуражного зерна полусухим способом с содержанием белково-фосфатного комплекса 340 ± 2 мг/г. В результате исследования установлено, что снижается зараженность зерна фитопатогенными грибами. Впервые использован белково-фосфатный комплекс в качестве консерванта фуражного зерна при хранении.

Практическая значимость. Разработан способ получения белково-фосфатного комплекса из фасоли, обладающего ингибиторной активностью по отношению к α -амилазам. Выявленные закономерности влияния ультразвука на белково-фосфатный комплекс позволяют получить целевой продукт с более высокой ингибиторной активностью. Установлено, что при обработке семян ржи белково-фосфатным комплексом происходит падение всхожести семян в результате торможения ростовых процессов за счет ингибирования амилаз зерна. Определены параметры ингибирования α -амилазы *Aspergillus oryzae* и панкреатической амилазы белково-фосфатным комплексом, что может быть использовано для создания фунгицидных композиций. Определены способы обработки зерна и концентрации белково-фосфатного комплекса, приводящие к ингибированию амилаз зерна, что является необходимым для разработки консерванта фуражного зерна. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы в сельском хозяйстве для разработки композиции для снижения численности фитопатогенной микрофлоры, обладающей амилазной активностью.

Положения, выносимые на защиту:

1. разработан способ получения белково-фосфатного комплекса, обладающего ингибиторной активностью по отношению к амилазам зерна, α -амилазе *Aspergillus oryzae*, панкреатической амилазе;

2. под действием ультразвука происходит изменение физико-химических свойств белково-фосфатного комплекса и увеличение ингибиторной активности;

3. выявлено, что белково-фосфатный комплекс ингибирует активность α -амилаз *Aspergillus oryzae*, панкреатической амилазе и амилаз ржи;

4. результаты обработки фуражного зерна, полученным белково-фосфатным комплексом и оценка влияния белково-фосфатного комплекса на прорастания семян зерновых культур и фитопатогенных грибов.

Степень достоверности и апробация результатов. Массив экспериментальных данных получен с использованием современных методов и оборудования в трех-пятикратной повторности; результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – стандартного отклонения по выборке. Исследования подтверждается их воспроизводимостью и корреляцией экспериментальных данных, полученных с применением независимых взаимодополняющих методов, а также их согласованностью с известными литературными данными.

Материалы диссертации были представлены на научных конференциях и съездах, среди которых: научно-практическая конференция, приуроченная ко Дню российской науки (Тверь, 2017), III Международная научно-практическая конференция с научной школой для молодежи (Тверь, 2017), 23-й Международный конгресс по химической и технологической инженерии CHISA и 21-я конференция по интеграции процессов, моделированию и оптимизации для энергосбережения и снижения загрязнения PRES (Прага, 2018), VII международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 2019), II Международная научно-практическая конференция «Наука и инновации: исследования и достижения» (Пенза, 2019), девятая Международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика» (Тверь, 2019), XXV Каргинские чтения. Всероссийская научно-техническая конференция молодых учёных «Физика, химия и новые технологии», посвященная Международному году Периодической таблицы химических элементов (Тверь, 2019), VIII Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020), 20-я Международная междисциплинарная научная конференция SGEM (София, 2020), I межвузовская научно - практическая конференция (Тверь, 2020), IX Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Севастополь, 2021), Всероссийская (национальная) научно-практическая конференция (Тверь, 2021), VI Международная научная конференция (Уфа, 2021), XXVII Каргинские чтения, Всероссийская научно-техническая конференция молодых учёных, посвященная Году науки и технологий (Тверь, 2021), VI Всероссийская научно-практическая конференция (Тверь, 2022), Всероссийская конференция с международным участием и элементами научной школы для молодежи «Экотоксикология-2022» (Тула, 2022), VII Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых, посвященная памяти д.х.н. В.В. Лукова (Ростов-на-Дону, 2022), V Международная научно-практическая конференция «Инновации в индустрии питания и сервисе» (Краснодар, 2022), XXVIII Каргинские чтения, Всероссийская научно-техническая конференция молодых учёных (Тверь, 2022), VII Всероссийская научно-практическая конференция (Тверь, 2023).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Работа соответствует паспорту научной специальности ВАК 1.5.6 – Биотехнология (отрасль науки – биологические, ветеринарные, сельскохозяйственные, фармацевтические, медицинские) по п. 7, п. 25.

Личный вклад автора состоял в сборе и анализе литературных данных, получении экспериментальных результатов, участии в обработке и анализе полученных данных, написании и оформлении публикаций.

Публикации результатов работы. По материалам диссертации опубликовано 29 печатных работ, в том числе 2 работы в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ, 2 работы, входящие в международную реферативную базу данных Scopus, 1 заявка на патент.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, выводов, списка использованной литературы, включающего 192 источника. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, иллюстрирована 47 рисунками, 8 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, изложены цель и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость.

В первой главе представлены исследования и сведения о перспективности применения белоксодержащих компонентов растительного сырья в сельском хозяйстве, медицине, пищевой промышленности. Приведен сравнительный анализ состава белковых веществ бобовых культур с целью выбора более значимого сырьевого ресурса, обогащенного белками. Рассмотрены вопросы переработки бобовых культур, а также возможное применение получаемых продуктов. Показана эффективность ультразвуковой обработки при получении белковых продуктов из растительного сырья. В сельском хозяйстве особое внимание уделяется сохранению питательных свойств фуражного зерна при его консервации и хранении до момента скармливания животным. В связи с этим рассмотрены методы сохранения зерновых культур с помощью биологических агентов и химических добавок. Изучены достоинства и недостатки методов консервирования фуражного зерна. Были отмечены легкость их осуществления и экономическая целесообразность. В сельском хозяйстве в последние десятилетия активно используются пестициды для увеличения срока хранения зерна. Однако до сих пор не установлено влияние пестицидов на организм человека, в связи с этим представляет интерес получение природных ингибиторов ферментов в качестве консервантов зерновых.

Во второй главе обозначены объекты исследования и применяемые методики. В качестве объекта исследования были выбраны семена красной фасоли Кидни и белой фасоли Бланш марки «Мистраль» Описан метод выделения белков из растительного сырья. Представлены методики: количественного определения белка, определения липидов и фосфатов в растительном сырье, методика определения амилолитической активности ферментов, методика определения активности ингибиторов. Представлены метод для анализа размеров полученных частиц, термогравиметрический анализ и методика исследования ИК-спектров.

Для изучения влияния полученного белково-фосфатного комплекса на амилазы зерна использовали озимую рожь сорта «Дымка». Проращивание семян проводилось в соответствии с требованиями ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести».

В третьей главе представлены результаты проведенного исследования и их обсуждение.

На первом этапе исследования было проведено выделение белков из фасоли. Изучено влияние условий экстракции на выход белковых веществ из фасолевой муки:

характер экстрагента (таблица 1), гидромодуль, условия экстракции (температура, время, внешнее воздействие).

Таблица 1 – Влияние природы экстрагента на количество белка в экстракте

Экстрагирующий раствор	Содержание белка, мг/г
Вода	189±3
0,1 н NaCl	228±4
0, 1 н HCl	151±3
0, 1 н NaOH	239±5
Фосфатный буфер с рН 9	252±2
Фосфатно-цитратный буфер с рН 9	248±2

На основе данных таблицы 1 в качестве экстрагента был выбран фосфатный буфер. Наибольшее количество извлеченного белка 263±2 мг/г было достигнуто при использовании фосфатного буфера с рН 8, гидромодулем 1 к 15 и продолжительностью процесса 30 минут.

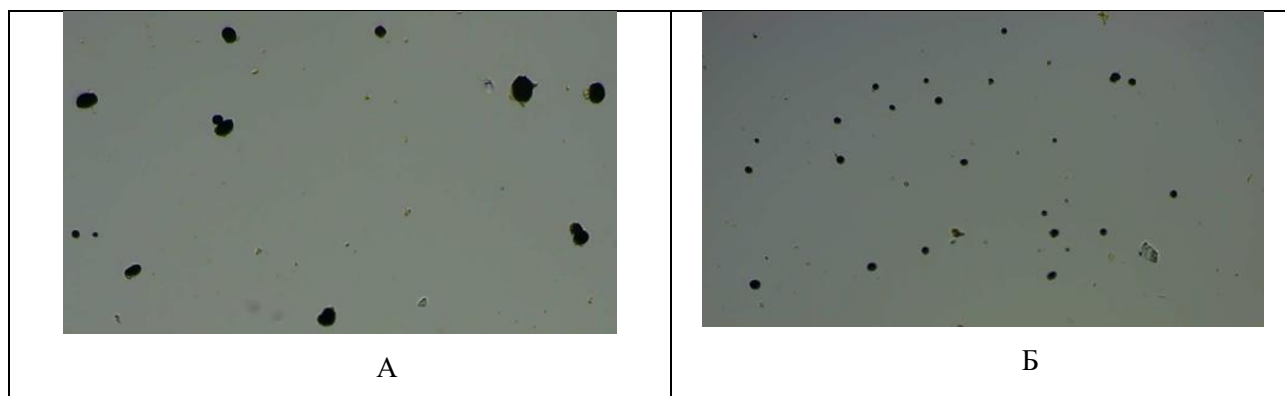
Для интенсификации процесса экстракции используют различные методы, которые позволяют ускорить процесс и увеличить количество получаемых биологически активных веществ. Одним из подобных методов является ультразвуковая обработка (Муканова, 2019). Эффективное извлечение белковых веществ в раствор в ультразвуковом поле связано с частичным разрушением клеточной стенки фасоли. Для экспериментов была выбрана ультразвуковая ванна Elmasonic S S15H с параметрами 95 Вт, 50/60 Гц. Результаты исследования влияния времени УЗ-воздействия представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние ультразвука на количество белка в экстракте

Ультразвуковая экстракция		Количество белка, мг/г
Время, мин	Температура по окончании процесса, °С	
5	29	290±2
10	35	340±2
15	41	300±3
20	52	236±3

Ультразвуковая экстракция позволила увеличить максимальное количество извлеченного белка (с 263±2 мг/г до 340±2 мг/г) при сокращении времени экстракции с 30 до 10 минут.

Следующим этапом работы стало выделение белково-фосфатного комплекса из экстракта, но первоначально осуществляли процесс отделения белкового экстракта от крахмал-целлюлозного жмыха фасоли. Под действием ультразвука происходит модификация крахмала, вследствие уменьшения размера крахмального зерна (рисунок 1). Для отделения крупных крахмальных фракций использовали центрифугу с охлаждением (5°C). Снижение температуры процесса вызывает уменьшение текучести раствора и повышение твердости крахмала за счет явлений ретроградации и кристаллизации линейной части полимера (Шох, 1975). По истечению 5 минут центрифугирования экстракта со скоростью вращения 4000 об/мин в растворе уже не обнаруживался крахмал. Более тонкую очистку осуществляли фильтрованием под вакуумом для отделения белкового раствора от взвешенных частиц зерновых оболочек.



А - крахмальные зерна без ультразвукового воздействия, Б – крахмальные зерна после ультразвуковой обработки в течение 10 минут

Рисунок 1 – Микрофотографии экстракта крахмала (увеличение x 640)

Для осаждения белковых веществ из раствора подбирали вещество, обладающее хорошей агрегацией и не способное вступать в реакцию с белками. Использовали спирт, толуол и ацетон (рисунок 2). Осаждение белково-фосфатного комплекса толуолом происходит в меньшей степени, чем осаждение ацетоном и высокоочищенным спиртом. Максимальный выход комплекса белков с фосфатами наблюдался при соотношении фильтрат:ацетон: - 1:2. Для отделения белково-фосфатного комплекса полученный раствор фильтровали на вакуум-фильтре. Для удаления воды, липидов и фенольных соединений полученный осадок обрабатывали диэтиловым эфиром в количестве 7,5 мл на 1 г.

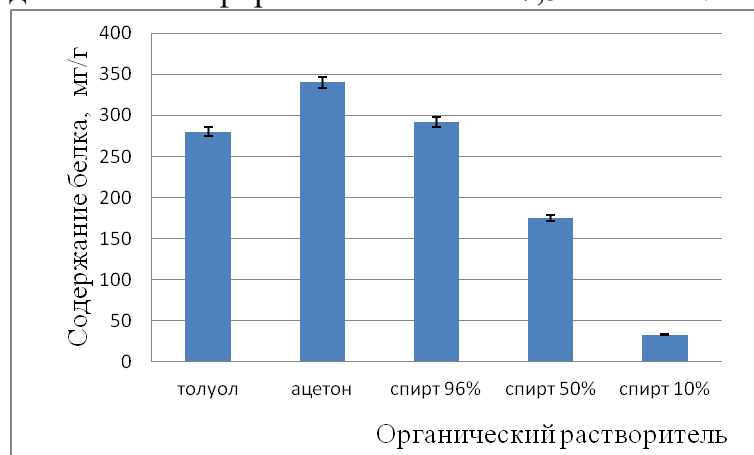


Рисунок 2 – Влияние органических веществ на содержание белковых веществ

Следующим этапом работы было изучение влияния белково-фосфатного комплекса на активность α -амилаз: *Aspergillus oryzae* (амилолитическая активность ~ 33 ед/мг), панкреатической (амилолитическая активность ~ 13 ед/мг).

Исследования с α -амилазой *Aspergillus oryzae* проводили при 30°C, pH 8, концентрация α -амилазы 0,05%, в течение 20 мин. Наибольшее понижение амилолитической активности фермента до 200 ед/г наблюдалось в диапазоне концентраций от $0,01 \cdot 10^{-4} \%$ до $0,1 \cdot 10^{-4} \%$ (рисунок 3).

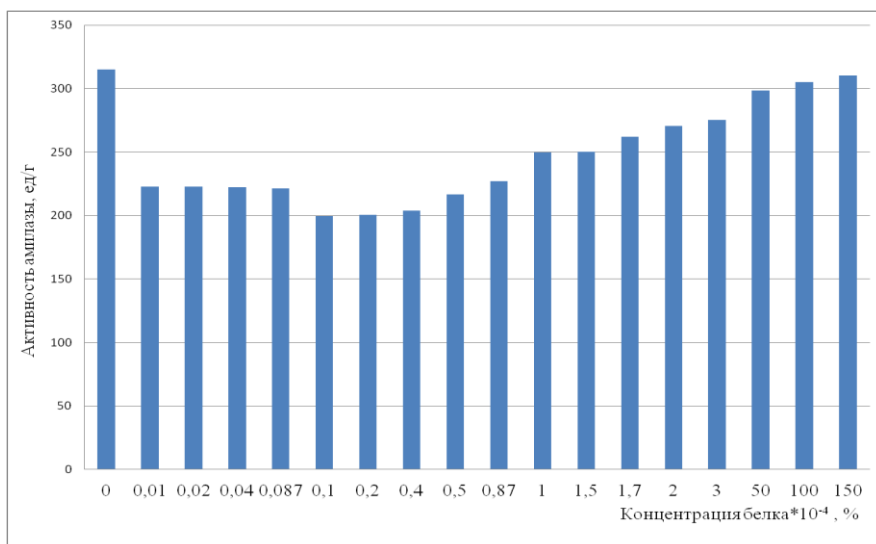
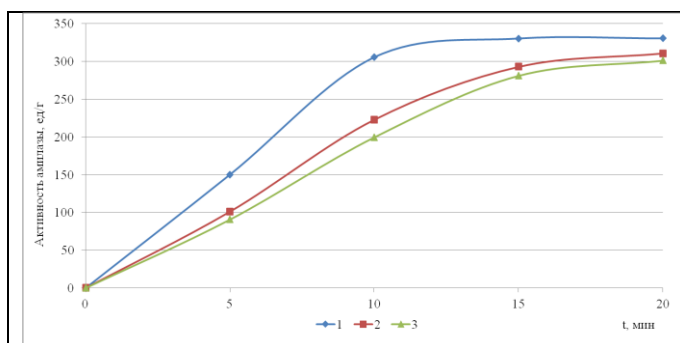


Рисунок 3 – Зависимость активности грибной амилазы на 10 минуте при разной концентрации растворов ингибитора

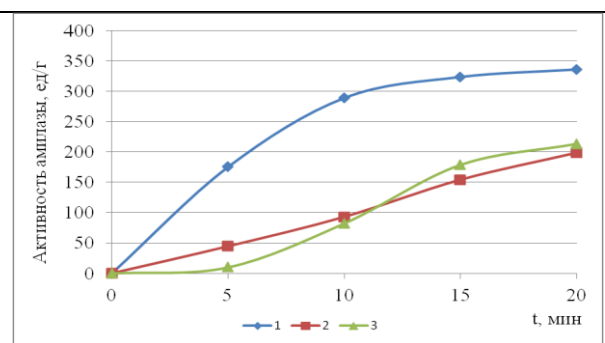
Максимальное снижение ферментативной активности в пробах достигает 29% от исходной активности фермента.

В дальнейшем изучалось влияние белково-фосфатного на протекание ферментативной реакции с участием амилазы *Aspergillus oryzae* (рисунок 4). Для проведения экспериментов были выбраны концентрации ингибиторов 0,000001% и до 0,00001%.



1 – Активность α -амилазы без добавления ингибитора; 2 – активность α -амилазы при добавлении раствора ингибитора с концентрацией 0,000001%; 3 - активность α -амилазы при добавлении раствора ингибитора с концентрацией 0,00001%

Рисунок 4 – Зависимость активности грибной α -амилазы *Aspergillus oryzae* при добавлении растворов ингибитора разных концентраций от времени



1 – Активность α -амилазы без добавления ингибитора; 2 – активность α -амилазы при добавлении раствора ингибитора, полученного из белой фасоли; 3 – активность α -амилазы при добавлении раствора ингибитора, полученного из красной фасоли

Рисунок 5– Зависимость активности грибной α -амилазы *Aspergillus oryzae* при добавлении ингибиторов с концентрацией $0,1 \cdot 10^{-4}$ %, полученных из разных видов фасоли от времени

На основании графика можно говорить о том, что максимальное ингибирование происходит на 10 минутах реакции, затем активность α -амилазы увеличивается, но не достигает контроля. По ходу ферментативной реакции, активность растворов α -амилазы с ингибитором остается ниже на протяжении всего исследуемого времени, и по истечении 15 минут протекание ферментативной реакции приостанавливается. Таким образом, между ингибитором и ферментом образуется нестабильный комплекс, который зависит от концентрации ингибитора и субстрата.

Были проведены опыты по влиянию сорта фасоли на величину ингибирующей способности белково-фосфатного комплекса (рисунок 5). Ингибиторы из белой фасоли образуют более стабильный комплекс с ферментом, чем из красной. Однако в первые 10 минут, наибольшей ингибиторной активностью обладает белково-фосфатный комплекс из красной фасоли.

В дальнейшем изучалось влияние белково-фосфатного комплекса на протекание ферментативной реакции с участием панкреатической амилазы (концентрация – 0,6%) при температуре 30°C, рН 7,13 в течение 20 мин. Для исследования использовали белково-фосфатный комплекс, полученный без ультразвукового воздействия.

Далее определяли оптимальную концентрацию ингибирующего вещества. Наибольшее снижение активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора с концентрацией 1% (рисунок 6). Максимальное ингибирование фермента происходит на 10 минуте и составляет 49% от контроля. На 20 минуте активность фермента увеличивается на 30%. Таким образом, механизм действия белковых ингибиторов, выделенных из фасоли, одинаков, как для панкреатической амилазы, так и для грибной. Стабильный комплекс «фермент-ингибитор» сохраняется только в течение 10 минут.

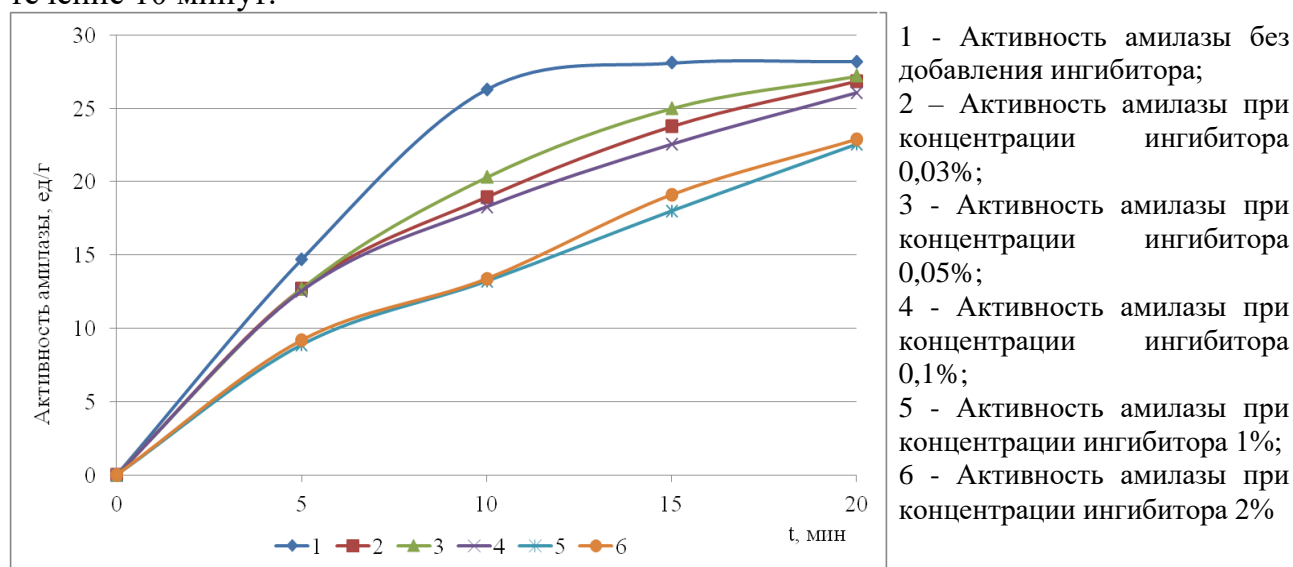


Рисунок 6 – Зависимость активности амилазы при добавлении различной концентрации ингибитора от времени

Также были проведены испытания с белковыми ингибиторами, полученными ультразвуковой экстракцией. Наибольшим ингибирующим действием обладает ингибитор, полученный обработкой ультразвуком – 15 минут. Ингибирование панкреатической амилазы на 10 минуте достигает 43%, затем активность увеличивается до 89% от контроля.

Далее изучался химический состав белково-фосфатного комплекса, фасолевого муки (таблица 3). При изучении аминокислотного состава методом капиллярного электрофореза в соответствии с методиками было определено 20 аминокислот. В белково-фосфатном комплексе в преобладающих концентрациях находится аргинин (1,73±0,69%) и лизин (1,63±0,55%).

Таблица 3 – Основная характеристика белкового комплекса, полученного ультразвуком и холодной экстракцией, выделенного из фасоли

Компоненты белково-фосфатного комплекса	Содержание в продукте, полученного УЗ-экстракцией	Содержание в продукте, полученного холодной экстракцией
Липиды, %	0	0,5±0,01
Крахмал, %	0	0
Сырой протеин, %	39,2±0,01	37,3±0,01
Азот, %	6,27±0,01	5,97±0,01
Калий, %	1,78±0,01	1,35±0,01
P ₂ O ₅ , %	21,97±0,01	21,23±0,01

Белково-фосфатный комплекс имеет в своем составе кроме фосфатов и белков, остатки пуриновых оснований, восстанавливающие сахара. Наличие сахаров может свидетельствовать о содержании в белковом комплексе фасоли сложных белков – гликопротеидов. Фитогемагглютинин является гликопротеидом и антипитательным фактором, который содержится в фасоли. Он состоит из белкового домена, специфически связанного с маннозой, галактозой и N-ацетилглюкозамином (Борисова, 1999). Хроматографический анализ белкового гидролизата показал наличие галактозы, маннозы, ксилозы и глюкозы. Таким образом, в составе изучаемого белково-фосфатного комплекса содержатся гликопротеиды.

В дальнейшем изучали размер частиц белково-фосфатного комплекса на анализаторе размеров частиц 90Plus/MAS при углах анализа 15° и 90°. Для точного определения размеров и идентификации агрегатов разных размеров в белковых растворах необходимо проводить измерения под большим углом (90°) (Базулева, 2022). Распределения частиц для белково-фосфатного комплекса, полученного из красной фасоли (рисунок 7), состоят из трех различимых пиков. Наибольшая интенсивность показана агрегатами белков с фосфатами. Исследования распределений образцов белков фасоли, экстрагированных из сырья под действием ультразвука, позволили обнаружить уменьшение размера частиц белково-фосфатного комплекса, исчезновение фракции выше 800 нм, а также существенное снижение димеров и мономеров. Перераспределение материала частиц в сторону меньших размеров может происходить за счет деградации белковых мицелл с фосфатом под действием ультразвука (Блинов, 2018). Через 15 минут остались в основном частицы размером от 380 до 620 нм (рисунок 8).

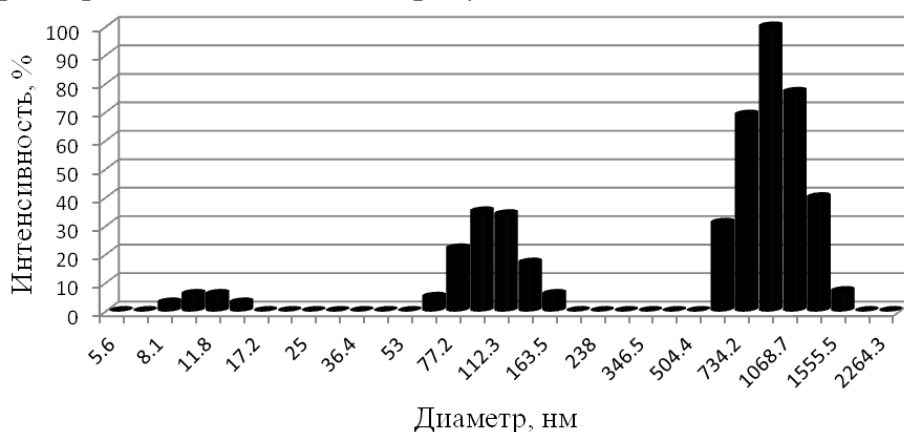


Рисунок 7 – Распределение интенсивности рассеянного света по размерам частиц в растворе белка фасоли, полученные в фосфатном буфере

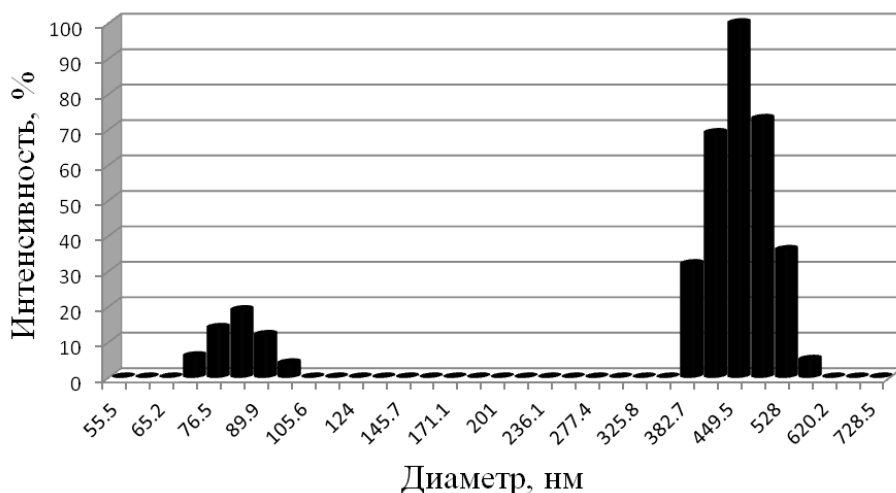


Рисунок 8 –
Распределение
интенсивности
рассеянного света по
размерам частиц в
растворе белка фасоли
(ультразвуковое
воздействие 15 минут)

Термографический анализ белково-фосфатного комплекса, полученного с ультразвуковой обработкой и без проводили в температурном диапазоне от 20°C до 600°C в среде аргона. В ходе термогравиметрического анализа было определено незначительное влияние ультразвука на изменение массы образца в диапазоне температур 150-200°C, 240°C. Это может свидетельствовать о чувствительности исследуемого образца в области высоких температур. В соответствии с исследованиями (Кононенко, 2019) при температуре 150-180°C происходит изменение массы образца за счет стеклования гликопротеинов. При температуре 283-291°C общее снижение биомассы образцов составляет 15,78% (при ультразвуке) и 20,96%. Предположительно, в данном диапазоне температур происходит разложение белковых компонентов (Нагорнов, 2010). При 380°C произошло последовательное отщепление аминокрупп и агломерация протеиновых частиц. Различия между образцами зависят от ультразвуковой обработки: наблюдается разрушение гликопротеидов и разложение белковых компонентов.

Были проведены исследования белково-фосфатного комплекса из фасоли методом инфракрасной спектроскопии при комнатной температуре. Полоса 2313 см⁻¹ обусловлена валентными колебаниями NH группы, образующей сильную связь N-H +...O (Май, 2016), полоса 1190 см⁻¹ (Kong, 2007) показывает метиленовые группы CH₂. В области от 1700 до 1600 см⁻¹ наблюдаются валентные колебания группы C=O в пептидной связи. Область от 1500 до 855 см⁻¹ может демонстрировать наличие большого количества фосфатных группировок P=O и P-O (Претч, 2006). Область 970-830 см⁻¹ указывает на наличие полосы, обусловленной колебанием P-O-P группы. Взаимодействие белковой части с фосфатными группировками может демонстрировать диапазон от 1190 до 1140 см⁻¹ (P-O-CH₃, P-O-C₂H₅), что указывает на образование белково-фосфатного комплекса. Также после ультразвука не наблюдается остатков тирозина и триптофана, что показывает отщепление их при кавитационном воздействии. Таким образом, ультразвук влияет не только на ингибиторную активность полученного белково-фосфатного комплекса, но и на его структурные особенности.

Далее была изучена эффективность использования получаемых белковых препаратов из семян красной фасоли сорта Кидни для протравливания семян озимой ржи Дымка с целью ингибирования процессов прорастания. Максимальная

суммарная амилолитическая активность ферментов проявлялась на 3-4 сутки проращивания, а затем постепенно снижалась.

При проращивании в чашках Петри в исследуемых образцах зерна ржи были обнаружены грибы рода *Alternaria* (рисунок 9), *Aspergillus* (рисунок 10), семейства *Zygomycota*.



Рисунок 9 – Грибы рода *Alternaria* под микроскопом при увеличении 640х

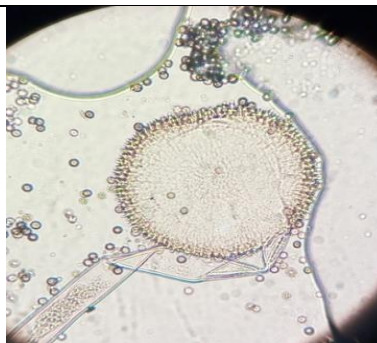


Рисунок 10 – Грибы рода *Aspergillus* под микроскопом при увеличении 640х

При добавлении ингибиторов с концентрациями от 0,1 до 13% рост грибов в чашках Петри визуально не был обнаружен.

В сельском хозяйстве для направленного замедления жизненных функций зерна используют консервирование препаратами различной природы. Для этого используют различные способы обработки собранного зерна: полусухой (опрыскивание) или мокрый (замачивание).

При мокром способе обработки семена проращивали в растворах белкового ингибитора с концентрациями в диапазоне от 0,1% до 10%. Полученные данные представлены на рисунке 11.

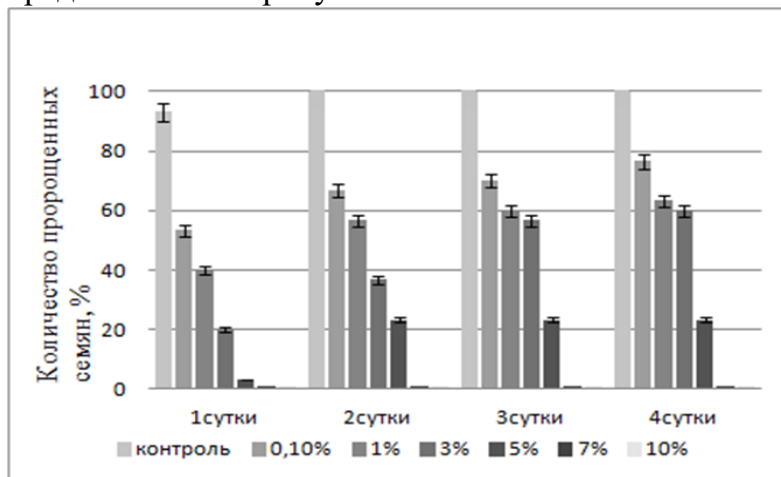


Рисунок 11 - Влияние белково-фосфатного комплекса на проращивание семян озимой ржи

Выявлено, что энергия проращивания экспериментальных образцов значительно ниже по сравнению с контрольным значением. Резкое снижение всхожести семян произошло в белковом растворе с концентрацией препарата 5% и составило всего 23,3% на четвертые сутки, а полное ингибирование проращивания – при концентрации 7%.

При увеличении концентрации белковых веществ в растворе пропорционально уменьшались корень и ростки. В воде средняя длина корня составила 3,32 см, ростка – 2,7 см. У растений, помещенных в раствор с минимальным количеством белка (1%), средняя длина корня составила 1,7 см, ростка – 0,6 см. Наблюдалось и снижение

массы пророщенных семян пропорционально к увеличению концентрации раствора ингибиторов. В водных растворах прирост биомассы семян составил $132,8 \pm 4,4\%$, а в белковых $96,9 \pm 1,3\%$, $79,718 \pm 4,9\%$, $71,48 \pm 0,4\%$, $69,2 \pm 0,5\%$, $68,87 \pm 2,2\%$ соответственно при концентрациях 1, 3, 5, 7, 10%.

Таким образом, полученный белковый препарат может быть использован для протравливания семян с целью ингибирования процессов прорастания. Вероятнее всего торможение биохимических процессов, происходящих в зерновке, связано с проникновением изучаемых белковых веществ через семенной покров в алейроновый слой семени и ингибировании там значительного количества синтезируемой α -амилазы. Так как α - и β -амилазы по отдельности не осуществляют полный гидролиз крахмала зерна с образованием моносахаров, то при ингибировании α -амилазы в эндосперме процессы прорастания зерна резко прекращаются.

Было изучено влияние времени выдерживания семян в суспензиях белковых ингибиторов на последующие процессы прорастания. Контролировали время выдерживания семян в растворе ингибитора с концентрацией 7%. Оптимальным временем выдерживания семян в растворе ингибиторов является 15 минут. В течение этого времени происходит снижение амилолитической активности в 1,8 раз.

Для полусухого способа обработки семян использовали растворы белковых препаратов с концентрациями в диапазоне от 1% до 13%. Обработанные, высушенные семена ржи использовали для проращивания в чашках Петри и в рулонах. Максимальная энергия прорастания семян ржи составила 64,3% при использовании 1%-го белкового раствора. При увеличении концентрации белков-ингибиторов до 10% в протравливающем растворе, энергия прорастания снизилась до 7,1%. Это также повлияло и на морфогенез семян растений (рисунок 12). Опыты проводились в рулонах в соответствии с ГОСТ 12038-84. Для получения устойчивого эффекта проращивали обработанное зерно через 8 месяцев после консервирования, поскольку зерно хранится в зернохранилищах с сентября по апрель. Экспериментальные данные по всхожести зерна представлены на рисунке 13.

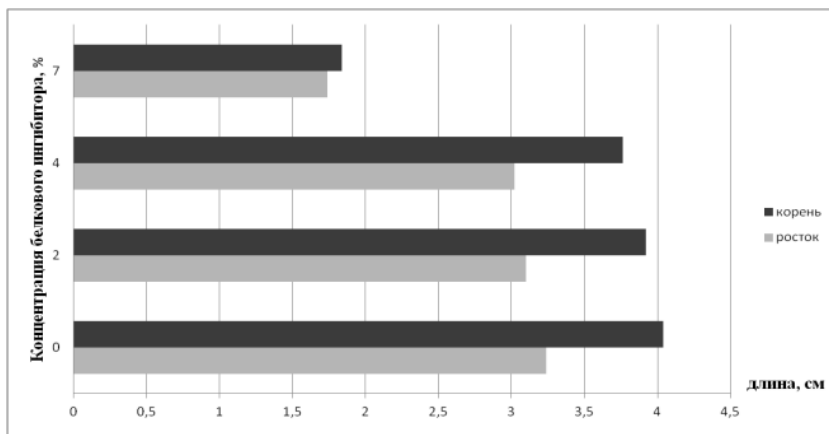


Рисунок 12 –Зависимость морфологических параметров семян ржи от концентрации белкового ингибитора

Жизнеспособность семян после отлежки увеличивается по сравнению со значениями после обработки зерна спустя неделю примерно в 4 раза (с 10,7% до 47%). Однако наиболее ярко-выраженное ингибирование прорастания зерна остается при концентрациях препарата 10 и 13%. Следовательно, полученный белковый препарат обладает направленным угнетающим действием по отношению к биохимическим процессам прорастания злаковых семян. Результаты опытов по

определению ферментативной активности амилаз по суткам отражают закономерность процессов, протекающих во всей биомассе проращиваемых семян.

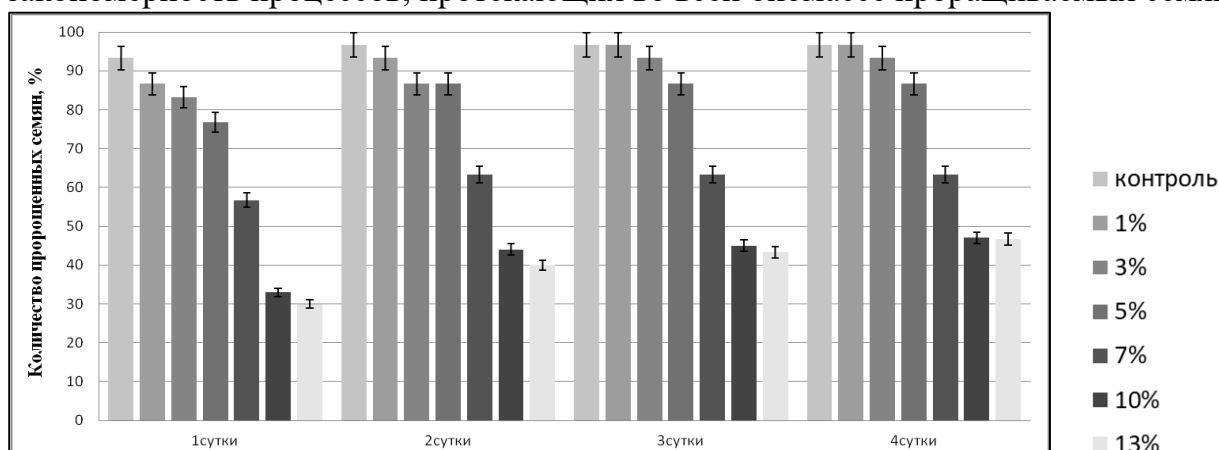


Рисунок 13 – Проращивание семян в зависимости от концентрации белково-фосфатного комплекса через 8 месяцев после обработки

Крахмалсодержащий жмых после экстракции белков сбраживали для изучения ингибирования роста дрожжей и синтеза спирта на начальных этапах культивирования продуцентов. Осуществляли гидролиз HCl 5 часов, нейтрализовали. Сбраживали гидролизованный раствор крахмалсодержащего продукта с помощью *Saccharomyces cerevisiae* при 31°C в течение 4 часов. Биомассу отделяли центрифугированием. Биомасса дрожжей увеличилась после процесса почти в 2 раза. Клетки после выращивания увеличились в размере, что говорит об их биохимической активности, были обнаружены почкующиеся клетки. Можно сказать, что фосфаты, присутствующие в растительном гидролизате, не ингибируют развитие дрожжей и позволяют осуществлять процесс брожения.

ВЫВОДЫ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1) Разработан способ получения белково-фосфатного комплекса из семян фасоли, обладающего ингибиторной активностью по отношению к α -амилазам. Способ осуществляется следующим образом: бобы фасоли измельчаются, просеиваются, мука с размера частиц менее 1 мм смешивается с фосфатным буфером pH 8 в соотношении 1:15, процесс экстракции проводится в ультразвуковой ванне в течение 15 минут без термостатирования. Разделение твердой и жидкой фаз осуществляется центрифугированием при температуре не выше 5°C с последующим фильтрованием. Белково-фосфатный комплекс осаждается из фильтрата охлажденным ацетоном (соотношение 1:2), промывается диэтиловым эфиром, сушится.

2) Под воздействием ультразвука происходит изменение распределения размера частиц, в том числе уменьшение размеров самой крупной фракции частиц белково-фосфатного комплекса с 734-1556 нм до 477-790 нм и существенное снижение фракции димеров и мономеров.

3) В состав белково-фосфатного комплекса входит 39,2% сырого протеина, фосфатов 21,97%, зольность 38,4 %, влажность 5%. ИК-спектры белковых частиц, полученных ультразвуковой экстракцией имеют метиленовые группы CH_2 полоса

1190 см⁻¹, что характеризует изменение структуры белка под действием ультразвуковой обработки и, как следствие, изменение его вторичной структуры, также после ультразвука не наблюдается остатков тирозина и триптофана, что показывает отщепление их при кавитационном воздействии.

4) Белково-фосфатный комплекс обладает ингибиторной активностью по отношению к α -амилазе *Aspergillus oryzae*, панкреатической амилазе, амилазе зерновых культур. Активность амилазы *Aspergillus oryzae* снижается с 305 ед/г до 200 ед/г на 10 минуте реакции. Наибольшее снижение активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора концентраций 0,000001% и 0,00001%. Дальнейшее уменьшение концентрации раствора ингибитора приводило к постепенному увеличению активности α -амилазы *Aspergillus oryzae*. Максимальное подавление ферментативной активности в пробах достигает 29% от исходной активности фермента. При использовании панкреатической амилазы наибольшее снижение активности наблюдается при добавлении растворов ингибитора концентраций 1%. Ингибирование панкреатической амилазы на 10 минуте достигает 43%, затем активность увеличивается до 89% от контроля.

5) При наличии на зерне грибов родов *Alternaria*, *Aspergillus* и семейства *Zygomycota* белково-фосфатный комплекс способен подавлять их развитие; методом протравливания можно ингибировать процессы прорастания в зерне, при концентрациях препарата 10% и 13% наблюдается наиболее оптимальных эффект подавления прорастания злаковых семян.

6) Исследования по использованию крахмалсодержащего жмыха, оставшегося после получения белково-фосфатного комплекса, показали, что возможно сбраживание прогидролизованного крахмалсодержащего продукта с помощью дрожжей. Сопутствующие вещества крахмалсодержащего продукта, в том числе фосфаты, не оказывают ингибирующее действие на развитие дрожжей и процесс брожения.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

А. Работы, включенные в международные реферативные базу данных Scopus, Web of Science и работы, опубликованные в научных журналах из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ

1. **Базулева В.А.** Анализ размеров белковых молекул, полученных из бобового растительного материала / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская, О.В. Манаенков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25. – № 1. – С. 34-38.

2. **Базулева В.А.** Характеристика свойств белково-фосфатного комплекса, выделенного из *Phaseolus vulgaris* в ультразвуковом поле / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская., М.Е. Григорьев // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2023. – № 4. – С. 49-56.

3. **Silchenko V.** Development of technology for the processing of beans in protein products and biofuel / V. Silchenko, E. Prutenskaya, E Sulman, A. Stepacheva, M. Sulman // 20th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2020. – P. 231-236.

4. **Silchenko, V.A.** A method of producing vegetable inhibitors isolated from the seed of bean. Application in pharmaceuticals / V.A. Silchenko, E.A. Prutenskaya, E.M.

Sulman, E.A.Savchenko // 23rd International Congress of Chemical and Process Engineering, CHISA 2018 and 21st Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction, PRES 2018. – 23. – 2018. – P. 402.

Б. Публикации в других изданиях

5. **Базулева В.А.** Белковые добавки растительного происхождения / В.А. Базулева, Е.А.Прутенская // Саморазвивающаяся среда технического вуза: научные исследования и экспериментальные разработки. – Тверь. – 2023. – С. 125-129.

6. **Базулева В.А.** Ингибиторы амилаз как специализированный компонент питания / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская // Инновации в индустрии питания и сервисе. – Краснодар. – 2023. – С. 450-451.

7. **Базулева В.А.** Биохимический состав фасоли и белковых веществ, извлеченных из нее / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. – 2023. – № 3. – С. 53-58.

8. **Базулева В.А.** Особенности хранения зерновых культур / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская // Современные технологии и инновации. – Тверь. – 2022. – С. 152-156.

9. **Базулева В.А.** Рациональное использование семян бобовых культур в биотехнологических процессах / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская // Экоотоксикология-2022. – Тула, 2022. – С. 182-183.

10. **Базулева В.А.** Изучение физико-химических свойств белковых частиц из фасоли / В.А. Базулева // XXVIII Каргинские чтения. – Тверь. – 2022. – С. 22.

11. **Базулева В.А.** Исследование молекул белковых веществ, выделенных из семян фасоли / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская // Химия: достижения и перспективы. – Ростов-на-Дону. – 2022. – С. 45-47.

12. **Базулева В.А.** Переработка крахмалсодержащих отходов из зернобобовых с целью получения биотоплива / В.А. Базулева, Е.А.Прутенская // Экологические технологии переработки отходов с получением новых материалов и энергоносителей. – Тверь. – 2022. – С. 6-7.

13. **Базулева В.А.** Использование белков бобовых культур в продуктах питания / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская // Саморазвивающаяся среда технического вуза: научные исследования и экспериментальные разработки. – Тверь. – 2022. – С. 77-81.

14. **Базулева В.А.** Исследование влияния методов очистки на размеры белковых частиц / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская // XXVII Каргинские чтения. – Тверь. – 2021. – С. 25.

15. **Базулева В.А.** Технология переработки крахмалсодержащего сырья фасоли в энергетические ресурсы / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская // Теория и практика процессов химической технологии (Марушкинские чтения). Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уфимский государственный нефтяной технический университет». – 2021. – С. 355-357.

16. **Базулева В.А.** Перспективы применения возобновляемого растительного сырья в производстве этилового спирта / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская // Направления развития российской науки: теоретические исследования и экспериментальные разработки студентов и аспирантов. – Тверь. – 2021. – С. 125-130.

17. **Базулева В.А.** Изучение влияния биологической активности белковых веществ фасоли на амилазы различного происхождения / В.А. Базулева, Е.А. Прутенская, М.Г.Сулман // Актуальная биотехнология. – 2021. – № 1. – С. 19-21.
18. **Сильченко В.А.** Получение белковых ингибиторов из бобовых культур и изучение их свойств / В.А. Сильченко, Е.А. Прутенская, А.И. Палихова // Химия в медицине: опыт, проблемы, перспективы. – Тверь. – 2020. – С. 53-55.
19. Палихова А.И. Получение крахмалсодержащего сырья для биотехнологических производств из бобовых культур / А.И. Палихова, **В.А. Сильченко** // Теоретические исследования и экспериментальные разработки студентов и аспирантов. Тверь. – 2020. – С. 209-213.
20. Прутенская Е.А. Разработка ресурсосберегающей технологии переработки бобов фасоли / Е.А. Прутенская, **В.А. Сильченко** // Актуальная биотехнология. – 2020. – № 3 (34) . – С. 46.
21. **Сильченко В.А.** Усовершенствование технологии переработки бобовых в белковые субстанции и биотопливо / В.А. Сильченко // XXV Каргинские чтения. – 2019. – С. 27.
22. **Сильченко В.А.** Изучение биологической активности белкового комплекса фасоли на амилазах эукариотических организмов / В.А. Сильченко, Е.А. Прутенская // Девятая международная научная конференция «Химическая термодинамика и кинетика». – 2019. – С. 311-312.
23. Прутенская Е.А. Основы получения крахмалсодержащего сырья из фасоли / Е.А. Прутенская, **В.А. Сильченко**, А.И. Палихова // Наука и инновации: исследования и достижения. Сборник. – 2019. – С. 74-77.
24. **Сильченко В.А.** Разработка технологии переработки фасоли в белковые продукты и биотопливо / В.А. Сильченко, А.И. Палихова, Е.А. Прутенская // Теоретические исследования и экспериментальные разработки студентов и аспирантов. – Тверь. – 2019. – С. 218-222.
25. **Сильченко В.А.** Изучение биологической активности ингибиторов *Phaseolus vulgaris* / В.А. Сильченко, Е.А. Прутенская, Л.А. Зайцева // Актуальная биотехнология. – 2019. – № 3 (30). – С. 367-369.
26. **Сильченко В.А.** Снижение антиалиментарных факторов при переработке бобовых / В.А. Сильченко, Е.А. Савченко, Е.А. Прутенская // Актуальные проблемы безопасности жизнедеятельности и экологии. – 2017. – С. 478-481.
27. **Сильченко В.А.** Исследование и разработка технологии выделения ингибиторов ферментов из растительного материала для создания диагностикумов / В.А. Сильченко, Е.А. Савченко // Теоретические исследования и экспериментальные разработки студентов и аспирантов ТвГТУ. Тверской государственный технический университет. – 2017. – С. 138-142.
28. Савченко Е.А. Применение растительных ингибиторов пищеварительных ферментов / Е.А. Савченко, **В.А. Сильченко**, П.О. Дроздова // Вестник Тверского государственного технического университета. – 2017. – № 1 (31). – С. 126-129.
29. **Сильченко В.А.** Разработка технологии выделения ингибиторов пищевых ферментов из растительного сырья для создания диагностических препаратов / В.А. Сильченко, Е.А. Савченко, О.В. Манаенков // Вестник Тверского государственного технического университета. – 2017. – № 1(31). – С. 133-137.