

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ

УДК 57.017.322;57.045

ВЫБОР СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЮТЕИНОВОГО КОНЦЕНТРАТА ИЗ ЛИСТЬЕВ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ЗЛАКОВЫХ, ЗАМОРОЖЕННЫХ ЕСТЕСТВЕННЫМ ХОЛОДОМ КРИОЛИТОЗОНЫ

© 2022 г. В. В. Нохсоров^{1, *}, В. Е. Софронова¹, К. А. Петров¹, Н. К. Чирикова²

¹Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, 677000 Россия

²Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, 677027 Россия

*e-mail: vv.nokhsorov@mail.ru

Поступила в редакцию 26.04.2022 г.

После доработки 11.06.2022 г.

Принята к публикации 14.06.2022 г.

В природных условиях Центральной Якутии дикорастущие растения в злаково-осоковых фитоценозах не успевают пройти весь цикл роста и уходят под снег в зеленом состоянии, образуя ценное криосырье для получения биологически активных веществ. Проведен сравнительный анализ для получения стабильного лютеинового концентрата из листьев злаковых *Poa pratensis* L., *Elytrigia repens* L. и *Avena sativa* L., замороженных при наступлении отрицательных температур. Выявлено, что в условиях криолитозоны Якутии наиболее подходящим растительным криосырьем для получения стабильного лютеинового концентрата является однолетний злак *A. sativa*, в котором содержание лютеина и зеаксантина составляет 3.56 мг/г. Количество лютеина и зеаксантина в лютеиновом концентрате из *A. sativa* составляет 73% от их содержания в концентрате из листьев ценного дикорастущего кормового злака *Poa pratensis* и в 2.3 раза больше, чем в концентрате из листьев другого злака *E. repens*. С применением ВЭЖХ и ВЭТСХ в пигментном составе лютеинового концентрата из *A. sativa* идентифицировано 17 компонентов, в том числе хлорофиллы (*a* и *b*), феофитины (*a* и *b*), феорфобиды (*a* и *b*) и 11 веществ каротиноидного ряда. Содержание лютеина составило 50.4%, β-каротина – 24.9% от суммы всех каротиноидов. Лютеиновый концентрат из листьев *A. sativa*, замороженных естественным холодом криолитозоны, может служить источником каротиноидов в рационе многих сельскохозяйственных животных.

Ключевые слова: криосырье, лютеиновый концентрат, злаки, *Avena sativa*, лютеин и зеаксантин, пигменты, холодное закаливание, лиофильно высушенные листья

DOI: 10.56304/S023427582204010X

Климат Якутии в осенний период благоприятен для производства зеленого криокорма, так как отрицательные температуры консервируют зеленую массу растений позднелетних сроков сева, не успевших пройти весь цикл роста и развития. В условиях многолетней мерзлоты овес посевной (*Avena sativa* L.) является второй после ячменя возделываемой ведущей зернофуражной культурой с яровым типом развития [1]. Установлено, что при различных технологиях заготовки кормов из естественных и посевных растений потери питательных веществ (белков, углеводов, жиров) составляют при полевой сушке до 45%, силосовании – 35, сенажировании – 20, а при консер-

вировании естественным холодом (криокорм) – только 5% [2].

Однако стандартная оценка производимого криокорма по содержанию кормовых единиц, клетчатки, углеводов, протеинов и жиров не дает полного представления о его ценности. Важное значение имеют пигменты: хлорофиллы и каротиноиды (Кар), способные оказывать положительное биологическое действие. Кар для животных и человека играют важную роль в качестве предшественников витамина А, фотопротекторов, антиоксидантов, а также способствуют повышению иммунитета и репродукции [3]. Витамин А (ретинол и его производные) признан эссенциальным пищевым компонентом для борьбы с инфекциями и высоким уровнем смертности населения [4, 5]. Если для человека, источниками витамина А являются продукты животного происхождения [6], то у травоядных сельскохозяйственных животных такими служат исключительно растительные корма.

Список сокращений: Био – виолаксантин, Кар – каротиноиды, Лют + Зеа – лютеин+зеаксантин, Нео – неоксантин, ТСХ – тонкослойная хроматография, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография, β- Кар – β-каротин.

Поиск природных источников Кар лютеина и зеаксантина достаточно актуален в настоящее время. Современные исследования позволяют отнести Кар, включая ксантофиллы, к основным соединениям, ответственным за поддержание зрительных функций. Ксантофиллы (лютеин и зеаксантин) практически не обладают А-провитаминной активностью, но они эффективны как антиоксиданты, и являются единственными из пигментов, транспортируемые в сетчатку глаз и формирующие желтый макулярный пигмент (макулярный ксантофилл). При этом они стабилизируют и компенсируют дистрофические процессы в сетчатке [6].

Содержание фотосинтетических пигментов и их соотношение у одно- и многолетних злаковых, произрастающих в условиях криолитозоны Центральной Якутии, подвергаются значительным изменениям в течение вегетационного периода [7, 8]. У молодых побегов многолетних злаковых трав — ломкоколосника ситкового (*Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski), пырейника сибирского (*Elymus sibiricus* L.) и костреца безостого (*Bromus inermis* Leys), произрастающих в Центральной Якутии с началом осеннего похолодания выявлено существенное повышение содержания Кар. В связи с этим в середине июля растения скашивали, чтобы стимулировать закладку новых вегетативных побегов. У ломкоколосника и костреца безостого прирост количества β -каротина (β -Кар) составляет 80 и 100%, Лют + Зеа возрастает на 38 и 50% соответственно. У пырейника сибирского содержание β -Кар, Лют + Зеа возрастает на 50 и 28% соответственно [9]. Каротиноиды функционируют как антиоксиданты, а также защищают фотосинтетический аппарат растения от излишков энергии возбуждения при воздействии естественной фотосинтетически активной радиации, что в условиях осенних низких положительных температур позволяет растениям своевременно завершить первую фазу холододового закаливания. Во второй фазе закаливания при воздействии отрицательных температур $-4, -9, -12^\circ\text{C}$ происходит усиление оттока свободной воды из клеток растений, ингибирование комплекса биохимических, биофизических процессов [8], и, как следствие, защита клеточных компонентов, в том числе пигментного комплекса от окисления (криоконсервация).

В условиях Центральной Якутии разработан способ заготовки зеленого криокорма из однолетнего холодоустойчивого злака — овса (*A. sativa*), заключающийся в позднелетних сроках сева (8–20 июля). Осенневегетирующие листья, подвергнутые холододовому закаливанию с начала сентября до середины октября, уходят под снег в зеленом состоянии (криосырье) [10].

Таким образом, криосырье, полученное из осенневегетирующих листьев злаковых растений при естественном замораживании, может служить пер-

спективным источником получения лютеинового концентрата, для использования в качестве дополнения к рациону многих сельскохозяйственных животных.

Целью настоящей работы является получение и сравнительная характеристика лютеиновых концентратов из криосырья дикорастущих злаковых *Elytrigia repens* L., *Poa pratensis* L. и *A. sativa*, а также из *Spinacia oleracea* L.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объекты и схемы проведения полевых экспериментов

Эксперименты проводили с июля по октябрь 2018 года. Основным объектом для исследования служил овес посевной (*A. sativa*) — однолетняя зерновая культура из семейства Мятликовых (*Poaceae*). Травянистое растение высотой 60–100 см. Стебель прямой, кустистый. Листья линейнозаостренные, длинные, шероховатые. Цветки — повислые колоски, собранные в раскидистую метелку. Цветет в мае–июне. Плод — зерновка. Культивируется как кормовое растение. В опытах использовали овес посевной сорта Якутский.

Помимо однолетнего овса посевного с целью сравнительного изучения содержания Кар, нами были использованы листья многолетних травянистых растений: пырей ползучий (*E. repens*) и мятлик луговой (*P. pratensis*), которые также могут служить перспективным источником Кар (Лют + Зеа). Кроме того, в качестве контрольного растения исследованы свежемороженые листья шпината огородного (*S. oleracea*), общеизвестного растения с высоким содержанием желтых пигментов.

Место проведения исследований: Россия, Центральная Якутия, г. Якутск, пригородная зона (62° с.ш. и 130° в.д.). Средняя температура воздуха за вегетационный период (июнь–сентябрь) составляла 14.1°C (рис. 1), сумма осадков за май–сентябрь 122.5 мм. В мае количество осадков было равно 10.3 мм. За июнь, июль, август, сентябрь выпало 19.9, 20.2, 51 и 21.1 мм осадков соответственно.

Растения *A. sativa* выращивали на опытном участке (площадь делянок 8 м^2), расположенном на средней пойме, р. Лена (рис. 2). Почвы участка — пойменные луговочерноземные, сформированные на легком суглинке. Агротехнику возделывания овса посевного для получения стабильного лютеинового концентрата проводили по общепринятой в Центральной Якутии агротехнологической схеме [10]. Посев семян производили в поздние сроки (15.07). Растения данного срока посева при наступлении замораживающих температур в начале октября находились в фазе трубкования. В качестве криосырья использовали замороженные зеленые флаговые листья овса, прошедшие холододовое закаливание (от $+8$ до -5°C)

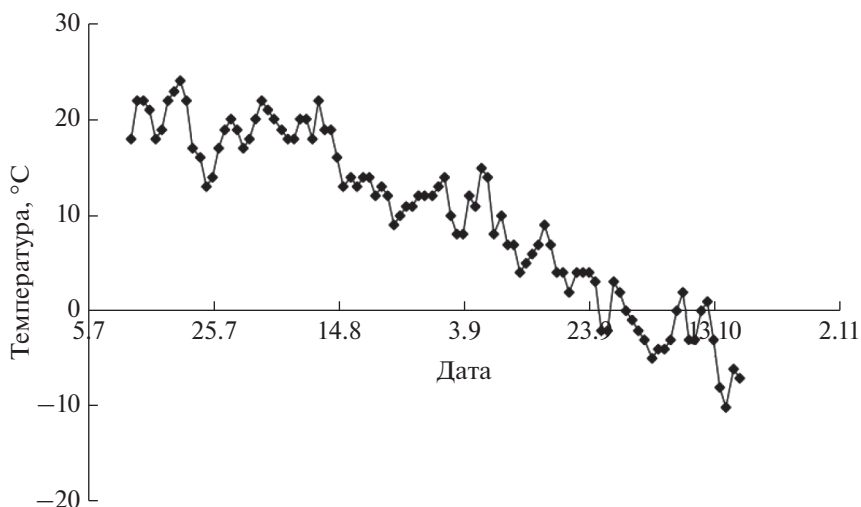


Рис. 1. Ход среднесуточной температуры в период: 12 июля по 17 октября в год эксперимента. Представлены данные Якутского республиканского центра по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды.

Fig. 1. The course of the average daily temperature in the period: July 12 to October 17 in the year of the experiments. Data of Yakut Republic Center for Hydrometeorology and Environmental Monitoring.



Рис. 2. Фото экспериментального участка с посевами *A. sativa*.

Fig. 2. Photo of the experimental plot with crops of *A. sativa*.

с начала сентября до первых чисел октября. Воздействие температур от -5 до -10°C приводило к замораживанию и гибели растений в течение суток (8–24 ч).

В экспериментах с дикорастущими злаками (*E. repens*, *P. pratensis*) в фазе начала колошения (первая декада августа) производили срезание побегов на высоте 4–5 см от земли с целью стимулирования закладки молодых побегов. Остальные растения служили контролем. Ежедневно измеряли высоту побегов 5 модельных растений каждого сорта и варианта. К отбору проб 8 октября много-

летние травянистые растения (*E. repens*, *P. pratensis*) прошли первую и вторую фазы закалывания. Не срезанные растения находились в фазе семяношения, срезанные – трубокования.

Получение стабильного лютеинового концентрата

В качестве криосырья использовали зеленые листья исследуемых объектов, собранные после воздействия замораживающих температур от -5 до -10°C в течение 10–14 дней в первой половине октября. Затем 3–5 г растительного материала измельчали, помещали в фарфоровую чашку, зали-



Рис. 3. Схема получения стабильного лютеинового концентрата из зеленого криосырья.
Fig. 3. Scheme for obtaining stable lutein concentrate from green cryogenic raw material.

вали жидким азотом, быстро растирали фарфоровым пестиком до получения однородной массы, при необходимости доливая жидкий азот по мере выпаривания. Замороженный материал быстро переносили в заранее приготовленные колбы для последующего лиофильного высушивания с помощью лиофилизатора фирмы VirTis (США). Порошкообразные лиофилизаты хранили в плотно закрытых криобирках с завинчивающимися крышками с силиконовыми уплотнителями при -80°C . Для извлечения каротиноидных пигментов, содержащих лютеиновый комплекс (Лют + Зеа), экстракцию проводили 96%-ным этиловым спиртом. С целью получения лютеинового концентрата после центрифугирования объединенные экстракты выпаривали под вакуумом до полного удаления этилового спирта.

Получение стабильного лютеинового концентрата из зеленого криосырья *A. sativa* схематически показано на рис. 3.

Анализ лютеиновых концентратов

Отбор проб растений (флаговый лист), замороженных низкими температурами в полевых условиях, проводили в первой половине дня с 3–4 разных экспериментальных площадок. Листья собирали в виде средней биомассы (2–5 г), состоящей из нескольких идентичных растений без корневой системы, с делянки площадью 1 м^2 для дикорастущих злаков, а для овса посевного как указано выше. Пробы фиксировали жидким азотом

сразу же после сбора образцов, непосредственно на месте произрастания растений, и транспортировали в сосудах Дьюара в лабораторию. Для выделения Кар листья (30 мг) экстрагировали 3–4 мл 96% этиловым спиртом с добавлением Na_2SO_4 (около 20–30 мг) и CaCO_3 (10–15 мг). Экстракт объемом 3–4 мл центрифугировали при $2-4^{\circ}\text{C}$. Экстракцию осадка повторяли 2 раза. Прозрачные супернатанты объединяли и концентрировали под вакуумом при комнатной температуре до 50 мкл.

Анализ полученных лютеиновых концентратов проводили методом ТСХ по модифицированной нами оригинальной методике [9]. 50 мкл полученного экстракта наносили на пластинку Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ, 10×10 см (Россия). Хроматографирование проводили, используя систему растворителей бензол : ацетон (7 : 3) до четкого отделения Лют + Зеа от других пигментов. По окончании их разделения пластинку вынимали из камеры, высушивали в токе азота. Отдельные полосы β -Кар, Лют + Зеа, Вио, Нео соскабливали и дважды элюировали этиловым спиртом. Объединенные элюаты центрифугировали (8000 g, 10 мин) на центрифуге Beckman J2-21 (Beckman, США) при $2-4^{\circ}\text{C}$. Полученные окрашенные в желтый цвет супернатанты доводили этиловым спиртом до 3 мл и использовали для количественного определения пигментов спектрофотометрическим методом при 446 нм с использованием диодно-матричного спектрофотометра Agilent 8453E (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Германия).

Расчет концентрации пигмента в исследуемом растворе проводили по формуле:

$$C = 1000D/\epsilon_{\lambda}l. \quad (1)$$

Где C – концентрация пигмента, мкг/мл раствора; D – оптическая плотность раствора при λ_{\max} 446; ϵ_{λ} – удельный коэффициент экстинкции индивидуального пигмента, см²/мг; l – длина оптического пути.

Содержание пигмента в пробе рассчитывали по формуле:

$$K = CV_1V_3/V_2, \quad (2)$$

где K – содержание пигмента (мкг/г) в исследуемом растительном материале; C – концентрация пигмента (мкг/мл) в фотометрируемом растворе; V_1 – суммарный объем (мл) первоначального экстракта; V_2 – объем экстракта (мл), нанесенного на хроматографическую пластинку; и V_3 – объем (мл) экстракта индивидуального пигмента с пластинки после хроматографирования.

Определение количественного содержания Кар в лиофильно высушенных листьях и лютеиновых концентратах проводили аналогично описанному выше для замороженных листьев, с той разницей, что для выделения каротиноидов брали навески 20 мг и 5 мг соответственно вместо 30 мг листьев.

Определение общего содержания Кар в спиртовых вытяжках всех проб проводили спектрофотометрически, используя величины оптических поглощений при длинах волн 662, 644 и 470 нм с поправками в максимумах поглощения [11].

Для более углубленной характеристики пигментов (хлорофиллов и каротиноидов) лютеинового комплекса *A. sativa* лютеиновый концентрат предварительно подвергали разделению с применением твердофазной экстракции на быстром оксиде алюминия (fast-Al₂O₃) в градиентной системе гексан-ацетон (100 : 0 → 0 : 100). В результате получен ряд фракций, объединенных согласно данным градиентной мультистеп-ВЭТСХ с реверсивным режимом съемки по оригинальной методике [12]. Для проведения количественной оценки содержания каждого из идентифицированных соединений применили метод ВЭЖХ [13], используя сравнительные данные о хроматографической подвижности соединений (ВЭТСХ, ВЭЖХ), данные УФ-, ИК- и МС-спектроскопии [12].

Полученные данные обрабатывали методом однофакторного дисперсионного анализа с уровнем значимости 0.05 в среде Microsoft Excel 2010. В таблицах и на рисунках представлены средние арифметические величины и их стандартные отклонения. Определение биохимических показателей проводили в 3 кратной повторности.

В таблицах приведены средние значения из трех повторностей и их стандартные отклонения $\pm SD$ ($n = 3$). Достоверность различий между сравниваемыми средними значениями оценивали с помощью t -критерия ($p < 0.05$), проверку гипотезы нормального распределения проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного эксперимента было выявлено, что в свежих листьях *A. sativa* количество Лют + Зеа было меньше на 104.42 мкг/г по сравнению с лиофильно высушенными (рис. 4).

Наибольшее абсолютное содержание Лют + Зеа было выявлено в лютеиновом концентрате овса, полученном из криосырья, где содержание данных соединений достигало 3.56 мг/г. Содержание β -Кар также было максимальным в лютеиновом концентрате по сравнению со свежими и лиофильно высушенными листьями овса посевного. В целом, суммарное содержание Кар было в 12.8 раз выше в лютеиновом концентрате по сравнению со свежими листьями. Таким образом, содержание суммарных и индивидуальных Кар в лютеиновом концентрате по сравнению со свежими и лиофильно высушенными листьями увеличивается на порядок (рис. 4).

В лютеиновом концентрате, полученном из листьев другого злака *E. repens*, количество Лют + Зеа было в 2.2 раза меньше по сравнению с концентратом полученного из листьев *A. sativa* (рис. 5). Содержание β -Кар было сопоставимым в лиофильно высушенных листьях и лютеиновом концентрате (рис. 5). Возможно, это связано с видоспецифичностью спиртового экстракта *E. repens*, содержащего в химическом составе компоненты, разрушающие β -Кар и Вио в ходе получения лютеинового концентрата.

Для сравнения было изучено содержание фотосинтетических пигментов у другого представителя злаковых – мятлика лугового (*P. pratensis*) (рис. 6). Количество желтых пигментов в лютеиновом концентрате из данного растения было выше, чем в свежих листьях и лиофильно высушенном материале. В лютеиновом концентрате *P. pratensis* было выявлено высокое содержание не только Лют + Зеа (4.86 мг/г), но и других каротиноидов Нео, Вио и β -Кар, что в конечном счете отразилось в количестве суммарного содержания Кар, которое в 1.9 раз было выше, чем в лютеиновом концентрате, полученном из *A. sativa*. В целом, лютеиновый концентрат мятлика лугового отличался самым высоким содержанием Кар среди изученных злаковых, произрастающих в условиях криолитозоны Якутии.

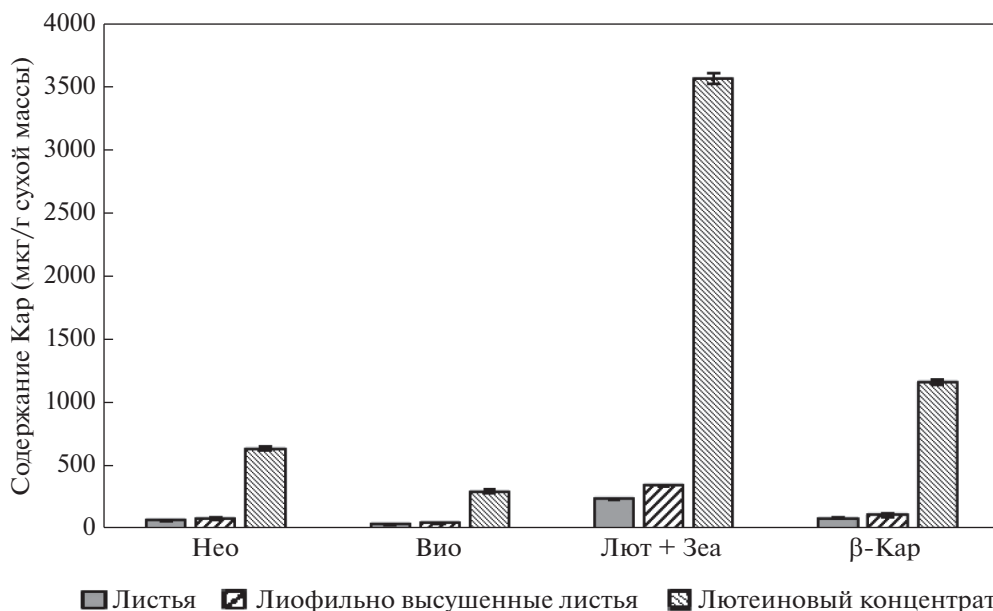


Рис. 4. Содержание индивидуальных Кар в свежих листьях, лиофильно высушенных и в лютеиновом концентрате овса посевного (*A. sativa*).

Fig. 4. The content of individual Cars in fresh leaves, freeze-dried leaves and in the lutein concentrate of oats (*A. sativa*).

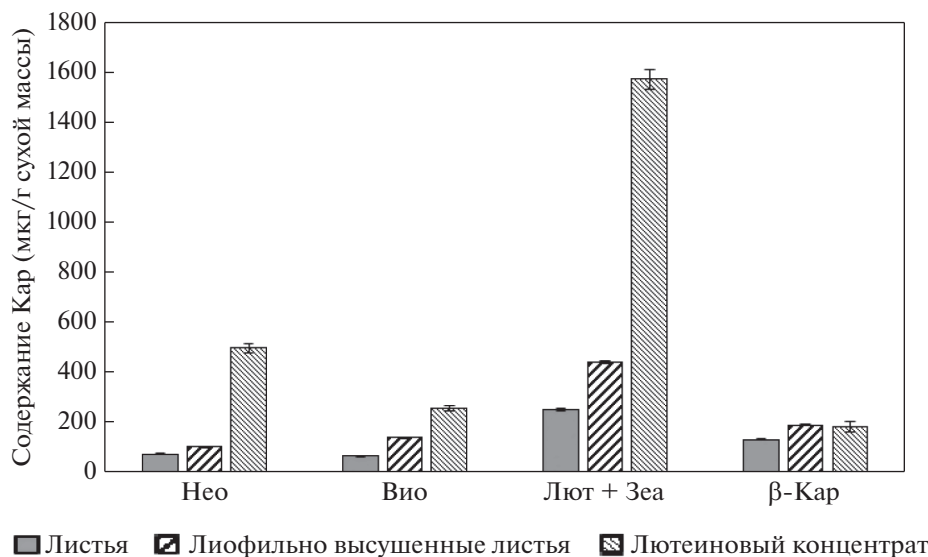


Рис. 5. Содержание индивидуальных Кар в свежих листьях, лиофильно высушенных и в лютеиновом концентрате пырея ползучего (*E. repens*).

Fig. 5. The content of individual Cars in fresh leaves, freeze-dried leaves and in the lutein concentrate of couch grass (*E. repens*).

Известно, что одним из богатых источников Кар среди овощных культур является шпинат (*S. oleracea*). Нами проведены эксперименты, аналогичные описанным выше, с использованием в качестве исходного криоматериала замороженных листьев шпината, имеющиеся в свободной продаже (Oerlemans Foods, Польша). Как следует из дан-

ных рис. 7, уровень содержания Лют + Зеа в лютеиновом концентрате, полученном из шпината, является наиболее высоким из всех изученных нами видов растений и достигал 8.2 мг/г.

Результаты анализа суммы ксантофиллов и Кар в свежих листьях, лиофильно высушенных и лютеиновом концентрате из овса посевного (*A. sativa*)



Рис. 6. Содержание индивидуальных Кар в свежих листьях, лиофильно высушенных листьях и в лютеиновом концентрате мятлика лугового (*P. pratensis*).

Fig. 6. The content of individual Cars in fresh leaves, freeze-dried leaves and in the lutein concentrate of bluegrass meadow (*P. pratensis*).

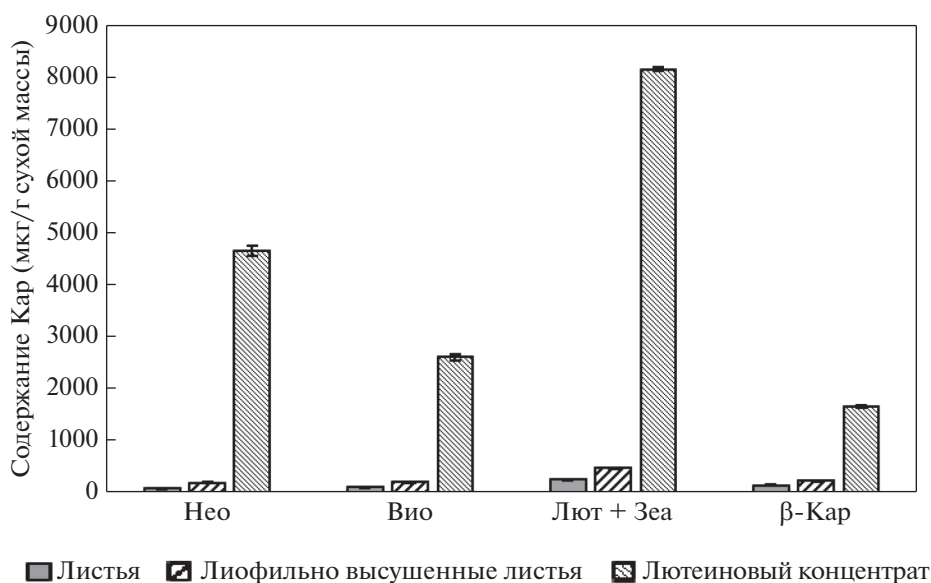


Рис. 7. Содержание индивидуальных Кар в размороженных листьях, лиофильно высушенных и в лютеиновом концентрате шпината (*S. oleracea*).

Fig. 7. The content of individual Cars in fresh leaves, freeze-dried leaves and spinach in lutein concentrate (*S. oleracea*).

и пырея ползучего (*E. repens*), представлены на рис. 8, а мятлика лугового (*P. pratensis*) и шпината (*S. oleracea*), на рис 9.

Согласно результатам сравнительного анализа, листья шпината превосходят по количеству как ксантофиллов, так и суммарного содержания Кар среди злаков, произрастающих в условиях многолетней мерзлоты.

Было изучено влияние длительного хранения при +5°C на сохранность Кар в лютеиновом кон-

центрате, полученном из замороженных естественных холодом листьев *A. sativa*. Как следует из данных, приведенных в табл. 1, содержание Кар существенно не изменялось и оставалось стабильным на уровне от 3.4 до 3.8 мг/г в течение 6 мес хранения.

Для получения характеристики состава пигментов лютеинового концентрата *A. sativa* проведен его ВЭЖХ анализ. Выявлено присутствие не менее 17 компонентов, в том числе 6 соединений группы хлорофиллов и 11 соединений каротиноидного ряда. Для идентификации использовали лите-

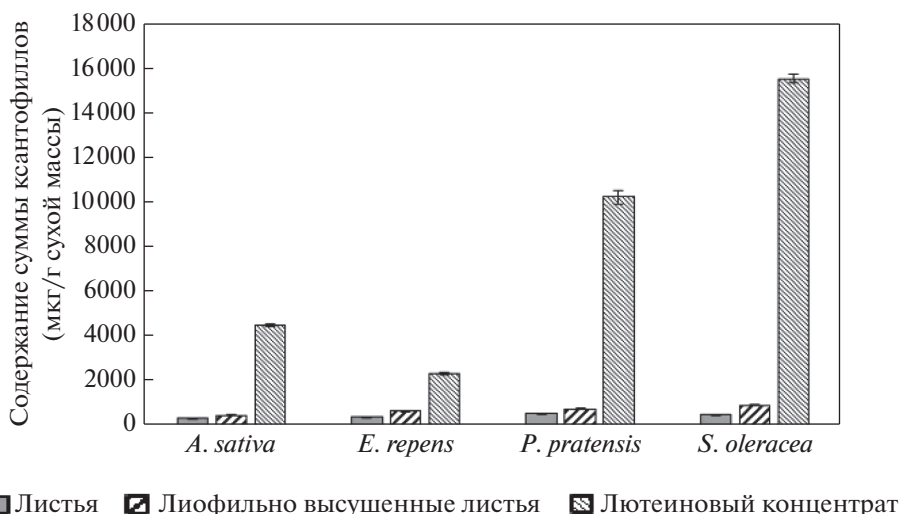


Рис. 8. Содержание суммы ксантофиллов в свежих листьях, лиофильно высушенных и в лютеиновом концентрате овса посевного (*A. sativa*), пырея ползучего (*E. repens*), мятлика лугового (*P. pratensis*) и шпината (*S. oleracea*).

Fig. 8. The content of the total xanthophylls in fresh leaves, freeze-dried leaves and in the lutein concentrate of oats (*A. sativa*), couch grass (*E. repens*), meadow grass (*P. pratensis*) and spinach (*S. oleracea*).

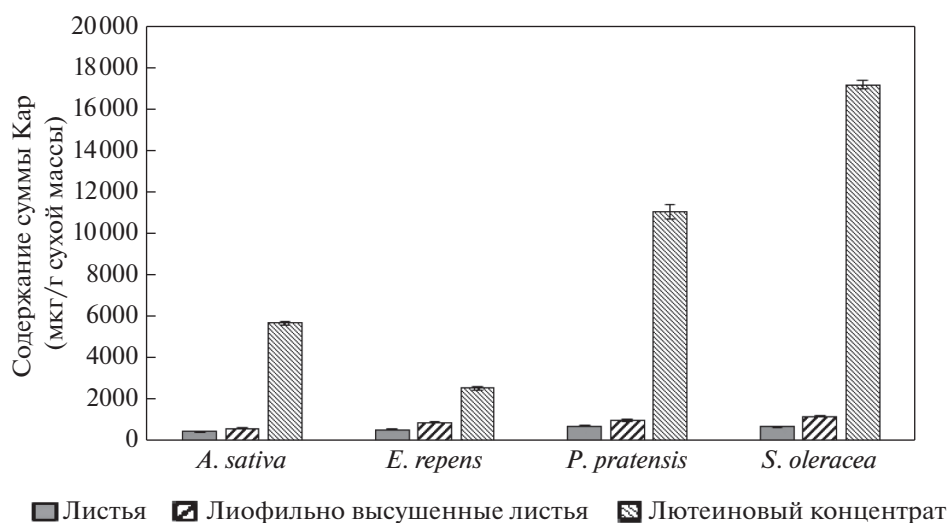


Рис. 9. Содержание суммы Кар в свежих листьях, лиофильно высушенных листьях и в лютеиновом концентрате овса посевного (*A. sativa*), пырея ползучего (*E. repens*), мятлика лугового (*P. pratensis*) и шпината (*S. oleracea*).

Fig. 9. The content of total Car in fresh leaves, freeze-dried leaves and in lutein concentrate of oats (*A. sativa*), couch grass (*E. repens*), bluegrass (*P. pratensis*) and spinach (*S. oleracea*).

ратурные показатели хроматографической подвижности соединений (ВЭТСХ, ВЭЖХ), данные УФ-, ИК- и МС-спектроскопии [12, 13].

В результате идентификации в лютеиновом концентрате *A. sativa* установлено присутствие двух хлорофиллов: хлорофиллы *a* и *b*, а также феофитины *a* и *b*, феофорбиды *a* и *b*. В составе Кар обнаружено 11 соединений: углеводороды – α-каротин, β-Кар, γ-каротин, моноолы каротинов – α-криптоксантин, β-криптоксантин, эпоксиды моноолов – эпоксиды криптоксантина (смесь изомеров),

диолы каротинов – Лют + Зеа, эпоксиды диолов – антраксантин (смесь изомеров), диолы диэпоксидов – Вио (смесь изомеров), полиолы каротинов – Нео (смесь изомеров). Доминирующими Кар в лютеиновом концентрате из овса посевного являются Лют и β-Кар (табл. 2), так от суммы Кар содержание Лют составило 50.4%, β-Кар 24.9% соответственно. В целом, сумма фотосинтетических каротиноидов: β-Кар, Лют, Нео, Вио, Зеа, антраксантин составила 90.5% от суммы всех Кар.

Таблица 1. Содержание лютеина и зеаксантина в лютеиновом концентрате *A. sativa* при разных сроках хранения в условиях низких положительных температур (+5°C)**Table 1.** The content of lutein and zeaxanthin in lutein concentrate from *A. sativa* raw materials at different periods of storage at low positive temperatures (+5°C)

Содержание Лют + Зеа, мг/г				
сроки хранения (дни)				
Контроль, 0 (26.2*)	51 (18.4)	141 (17.7)	169 (15.8)	201 (17.9)
3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.5 ± 0.2

Примечание: * в скобках приведены даты.

Note: * dates in brackets.

Таблица 2. Содержание индивидуальных Кар в лютеиновом концентрате *A. sativa***Table 2.** The content of individual Car in *A. sativa* L. lutein concentrate

Соединение	Содержание, % от суммы Кар	Содержание, мг/г в лютеиновом концентрате <i>A. sativa</i>
α-каротин	1.7	14.25
β-каротин	24.9	208.64
γ-каротин	0.4	3.35
α-криптоксантин	0.3	2.51
β-криптоксантин	0.8	6.70
эпоксиды криптоксантина	0.6	5.06
лютеин	50.4	422.31
зеаксантин	1.6	13.41
антраксантин	0.4	3.35
виолаксантин	3.5	29.33
неоксантин	9.7	81.30
Сумма идентифицированных соединений	94.3	790.21

Согласно полученным данным по убыванию содержания Лют + Зеа в лютеиновом концентрате исследованные растения можно поставить в следующий ряд:

S. oleracea → *P. pratensis* → *A. sativa* → *E. repens*.

Масштабное выращивание шпината в условиях Якутии ограничено климатическим фактором, поэтому внедрение данного вида является проблематичным. Использование мятлика лугового в качестве сырья для получения лютеинового концентрата в промышленных объемах является трудоемкой задачей, так как по морфологическим характеристикам и другим агротехнологическим признакам, в том числе по доступности семян это растение намного уступает более культурному виду – овсу посевному. Для мятлика лугового также характерны узколинейные листья, шириной всего до 4 мм, после укуса побеги этого злака вытягиваются медленно и достигают не больше 30 см, поэтому данное растение используют как газонную траву [14].

В качестве перспективного растения, на данном этапе исследований, нами выбран овес посевной *A. sativa*, так как для данной культуры агротехника выращивания хорошо разработана в экстремальных условиях многолетней мерзлоты Центральной Якутии [10, 15]. В этих условиях *A. sativa* является районированным холодоустойчивым кормовым растением.

Ранее при изучении сезонной динамики содержания фотосинтетических пигментов и их соотношений у многолетних злаковых растений (*Psathyrostachys juncea* Tzvel., *Elymus sibiricus* L., *Bromopsis inermis* Leys), произрастающих в условиях криолитозоны Центральной Якутии, с началом осеннего похолодания был отмечен существенный подъем содержания Кар виолаксантинового цикла и хлорофиллов [9]. В связи с этим для получения криосырья с повышенным содержанием Лют + Зеа, нами предложена технология получения стабильного лютеинового концентрата из листьев злаковых, замороженных естественным холодом

криолитозоны Якутии. Технологическая схема получения лютеинового концентрата включает лиофильное высушивание криосырья с последующей экстракцией пигментов этанолом, чем достигается концентрирование Лют + Зеа в конечном продукте. При этом одновременно происходит извлечение другого известного антиоксиданта β -каротина.

Таким образом, применение естественного холода – неограниченного и дешевого ресурса Сибири – для получения криосырья с высоким содержанием биологически активных веществ, последующее их выделение и создание биологически активной добавки к рациону многих сельскохозяйственных животных может быть интересным в области сельскохозяйственной биотехнологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Полевые работы по выращиванию растений были выполнены в рамках государственного задания Минобрнауки России по проекту “Исследование биогеохимических циклов и адаптивных реакций растений бореальных и арктических экосистем северо-востока России (FWRS-2021-0024; №1021061710242-7), анализ фотосинтетических пигментов был выполнен в рамках государственного задания Минобрнауки России (FSRG-2020-0019). Разработка способа получения биологически активных веществ из криосырья была проведена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук и докторов наук Российской Федерации (МК-1000.2021.5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Петрова Л.В. Оценка сортообразцов овса посевного (*Avena sativa* L.) методом многомерного ранжирования в Центральной Якутии. *Земледелие*, 2017, 5, 42–45.
- Румянцев В.А. Особенности возделывания однолетних кормовых культур на зеленый криокорм в Якутии. *Главный зоотехник*, 2009, 6, 57–60
- Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *J. Nat. Med.*, 2020, 74, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids volume 5: nutrition and health [Ed. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander]. In Birkhäuser, Basel, Switzerland, 2009, 467 p.
- Maoka T., Etoh, H. Some biological functions of carotenoids in Japanese food. In: Functional Foods of the East [Ed. J. Shi, C-T. Ho, F. Shahidi]. In CRC Press Boca Raton., 2010, 85–97.
- Vlaicu P.A., Untea A.E., Turcu R.P., Saracila M., Panait T.D., Cornescu G.M. Nutritional Composition and Bioactive Compounds of Basil, Thyme and Sage Plant Additives and Their Functionality on Broiler Thigh Meat Quality. *Foods*, 2022, 11, 1105. <https://doi.org/10.3390/foods11081105>
- Софронова В.Е., Петров К.А., Дымова О.В., Головки Т.К., Чепалов В.А. Фонд зеленых и желтых пигментов у ярового овса, культивируемого для получения криокорма в условиях Центральной Якутии. *Аграрный вестник Урала*, 2019, 4(183), 72–77. https://doi.org/10.32417/article_5cf9fc0d9620d9.917-29225
- Sofronova V.E., Chepalov V.A., Dymova O.V., Golovko T.K. Functional Condition of Photosystem II in Leaves of Spring Oats during Autumnal Decrease in Temperature. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2020, 67(4), 661–670. <https://doi.org/10.1134/S1021443720030206>
- Петров К.А., Софронова В.Е., Чепалов В.А., Перк А.А., Максимов Т.Х. Сезонные изменения содержания фотосинтетических пигментов у многолетних травянистых растений криолитозоны. *Физиология растений*, 2010, 57(2), 192–199.
- Румянцев В.А. Особенности возделывания однолетних кормовых культур на зеленый криокорм в Якутии. *Главный зоотехник*, 2009, 6, 57–60.
- Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148 / [Ed. Colowick S.P., Kaplan N.O.]. In Academic, 1987, 350–382.
- Shi Q., Wang H., Du C., Zhang W., Qian H. Tentative identification of torulene Cis/trans geometrical isomers isolated from *Sporidiobolus pararoseus* by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and preparation by column chromatography. *Anal. Sci.*, 2013, 29(10), 997–1002.
- Schwartz S.J., Patroni-Killam M. Detection of cis-trans carotene isomers by two-dimensional thin-layer and high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 1985, 33(6), 1160–1163.
- Pornaro C., Dal Maso M., Macolino S. Drought Resistance and Recovery of Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.) Cultivars under Different Nitrogen Fertilisation Rates. *Agronomy*, 2021, 11, 1128. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061128>
- Petrov K.A., Perk A.A., Chepalov V.A., Sofronova V.E., Ilyin A.N., Ivanov R.V. Eco-physiological and biochemical bases of the green cryo-feed forming in Yakutia (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, 52(6), 1129–1138. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1129eng>

Selection of Raw Materials for Obtaining Lutein Concentrate from Leaves of Plants of the Cereal Family Frozen by Natural Cold of the Cryolithozone

V. V. Nokhsorov^{a, #}, V. E. Sofronova^a, K. A. Petrov^a, and N. K. Chirikova^b

^a*Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 677000 Russia*

^b*Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, 677027 Russia*

[#]*e-mail: vv.nokhsorov@mail.ru*

Abstract—In the natural conditions of Central Yakutia, a significant part of wild plants in grass-sedge phytocenoses do not have time to go through the entire cycle of growth and development and go under the snow in a green state, forming a valuable cryogenic raw material for obtaining biologically active substances. A comparative analysis has been carried out to obtain a stable lutein concentrate from the leaves of cereals *Poa pratensis* L., *Elytrigia repens* L. and *Avena sativa* L., frozen at the onset of negative temperatures. It was found that, under the conditions of the permafrost zone of Yakutia, the most suitable plant cryogenic raw material for obtaining a stable lutein concentrate is the annual *A. sativa* grass, in which the content of lutein and zeaxanthin is 3.56 mg/g. The amount of these two compounds in the lutein concentrate from *A. sativa* is 73% of their content in the concentrate from the leaves of the valuable wild forage grass *P. pratensis* and is 2.3 times higher than in the corresponding concentrate from another grass *E. repens*. Using HPLC and HPTLC, 17 components were identified in the pigment fraction of the lutein concentrate from *A. sativa*, including chlorophylls (*a* and *b*), pheophytins (*a* and *b*) and pheophorbides (*a* and *b*), as well as 11 substances of the carotenoid series. The content of lutein and β -carotene was 50.4 and 24.9%, respectively, of the sum of all carotenoids. Lutein concentrate from the *A. sativa* leaves, frozen by the natural cold of the cryolithozone, can serve as a source of carotenoids in the ration of many farm animals.

Keywords: cryogenic raw material, lutein concentrate, cereals, *Avena sativa*, lutein and zeaxanthin, pigments, cold hardening, freeze-dried leaves