

УДК 663.18; 664.15

**М. И. Зимина<sup>1</sup>, С. Ю. Носкова<sup>1</sup>, Е. В. Ульрих<sup>2</sup>, К. С. Афанасьева<sup>1</sup>  
Н. С. Федотовских<sup>3</sup>, О. В. Кригер<sup>1</sup>**

**ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ КОРМОВЫХ АМИНОКИСЛОТ  
ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КОРИНЕБАКТЕРИЙ  
НА СОЕВОЙ МЕЛАССЕ**

68

<sup>1</sup>Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

<sup>2</sup>Калининградский государственный технический университет»,

Калининград, Россия

<sup>3</sup>Закрытое акционерное общество «Содружество-Соя», Светлый, Россия

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

Принята к публикации 29.08.2022 г.

doi: 10.5922/gikbfu-2022-3-5

**Для цитирования:** Зимина М.И., Носкова С.Ю., Ульрих Е.В., Афанасьева К.С., Федотовских Н.С., Кригер О.В. Особенности получения кормовых аминокислот при культивировании коринебактерий на соевой мелассе // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. 2022. №3. С. 68–92. doi: 10.5922/gikbfu-2022-3-5.

*В настоящее время соевые бобы и продукты переработки сои широко используются для получения пищевых продуктов и кормов для животных. Значительное содержание углеводов в соевой мелассе позволяет использовать ее в качестве компонента питательной среды для культивирования микроорганизмов, продуцирующих кормовые аминокислоты. Целью данной работы было изучение процесса биосинтеза кормовых аминокислот на среде из соевой мелассы с использованием штаммов бактерий рода *Corynebacterium glutamicum*. В качестве методов исследования использовались микроскопия, спектрометрия, рефрактометрия, рН-метрия и высокоэффективная жидкостная хроматография. Установлено, что при культивировании на соевой мелассе наибольшей способностью усваивать компоненты среды обладают штаммы *C. glutamicum* В-1002 и *C. glutamicum* В-1722. Добавление таких ростовых компонентов, как никотиновая кислота и NaCl, не оказывало значительного влияния на накопление биомассы *C. glutamicum* В-1002 и *C. glutamicum* В-1722. Доказано, что наилучшей средой для культивирования *C. glutamicum* является меласса, прошедшая весь технологический процесс и содержащая максимальное количество компонентов, необходимых для культивирования *C. glutamicum* и продуцирования кормовых аминокислот. На продукцию *C. glutamicum* кормовых аминокислот влияют такие факторы, как содержание сухих веществ и активная кислотность среды. Выявлено, что наилучшими продуцентами кормовых кислот являются штаммы *C. glutamicum* В-1002 и *C. glutamicum* В-1722, культивируемые на средах, составленных из соевой мелассы и дистиллированной воды в разведении 1:9.*



**Ключевые слова:** соевая меласса, *C. glutamicum* В-1002, *C. glutamicum* В-1722, *C. glutamicum* В-2306, кормовые аминокислоты, хроматограмма, культивирование, метаболиты

## Введение

Известно, что семена сои служат сырьем для широкого спектра пищевых и кормовых продуктов [1]. Основным биохимическим компонентом семян сои является белок. Содержание белка колеблется в среднем от 38 до 42 % и в некоторых случаях может достигать до 50 %.

Содержание жиров колеблется от 16 до 27 %. Углеводы составляют 22–35 % и включают в себя сахарозу, декстрины, гемицеллюлозу, небольшое количество моносахаридов и клетчатки. Содержание крахмала незначительно, 1–1,5 %. Так же в семенах сои присутствуют антипитательные вещества: ингибиторы протеазы, лектины [2–4] (фитогемагглютеины), уреазы, липоксигеназа [5–7].

Концентрированный десольвентизированный водно-спиртовой экстракт, полученный при обезжиривании соевого лепестка, путем выпаривания очищают от спирта. Раствор концентрируют до вязкой консистенции. На выходе соевая меласса представляет коричневую вязкую жидкость, имеющую горьковато-сладкий вкус с характерным запахом. Соевая меласса является источником сахара, волокон и белков. Также в ней присутствуют микро и макроэлементы [8–10]. Однако может наблюдаться изменение содержания компонентов ввиду использования сырья различного географического происхождения, сезона уборки урожая, условий хранения, технологии переработки и других факторов [10; 11].

Проанализировав данные литературных источников и исследований в области переработки соевой мелассы, можно сделать вывод, что высокий процент содержания углеводов позволяет использовать соевую мелассу в качестве компонента питательной среды для культивирования микроорганизмов [12–15].

Поддержание и подготовка чистой культуры являются важной преферментационной стадией, так как продуцент и его физиологические и биохимические характеристики, свойства определяют эффективность всего биотехнологического процесса.

Производство аминокислот в виде высокоочищенных кристаллических препаратов строится по схеме, типичной для получения и выделения вторичных метаболитов. Наиболее распространенный одноступенчатый микробиологический синтез любой аминокислоты предполагает размножение в несколько стадий исходной культуры продуцента на агаризованной среде, выращивание в маточных колбах, размножение культуры в системе инокуляторов и посевных аппаратах [9; 10; 16–18].

В дальнейшем осуществляют выращивание культуры в производственных ферментерах. После завершения ферментации, как правило, после предварительной обработки культуральной жидкости с целью улучшения фильтруемости проводят отделение клеток продуцента. Полученный таким образом нативный раствор подвергают предварительной очистке от окрашенных примесей с использованием сорбционных методов [10–13].



Целевую аминокислоту выделяют с помощью ионного обмена или методом осаждения. Элюаты, или маточные растворы, концентрируют вакуум-выпаркой, образующиеся технические кристаллы готового продукта очищают путем перекристаллизации из насыщенного раствора. Завершается процесс получения кристаллического препарата, как правило, вакуум-сушкой очищенных кристаллов и их упаковкой [16].

Побочными продуктами такого производства могут быть различные кормовые препараты, производимые на основе не утилизируемых маточных растворов выделяемой аминокислоты и отработанной биомассы продуцента, предварительно объединенной с обедненными стоками ионообменных колонн производства, промывными водами, идущими на очистку технологического оборудования, а затем высушенной до остаточной влажности около 10 % [17].

При выпуске кормовых препаратов аминокислот с невысоким содержанием основного вещества (не более 10 %) технология их производства предусматривает только стабилизацию раствора культуральной жидкости перед вакуум-упариванием, концентрирование сухих веществ культуральной жидкости на вакуум-выпарной установке, стандартизацию упаренного раствора путем добавки соответствующего количества наполнителя, сушку готового продукта и его упаковку [16].

При получении технических или кормовых препаратов с повышенным содержанием основного вещества дополнительно могут осуществлять отделение клеток продуцента и частичное концентрирование аминокислоты в нативном растворе методом ионного обмена или осаждения [18].

Поскольку в одноступенчатом способе производства аминокислот в качестве продуцентов используются ауксотрофные мутанты, требующие для своего роста и биосинтеза вторичных метаболитов среды, содержащие легкоусваиваемые источники углерода, азота и такие биологически активные вещества, как витамины, его организация возможна только в строго асептических условиях. При этом особое внимание обращается не только на стерилизацию используемых питательных сред и подаваемого воздуха, всего технологического оборудования и коммуникаций, но и на строжайшее соблюдение всех регламентных требований, обеспечивающих строго асептическое промышленное культивирование данного микроорганизма [16].

Целью данной работы было изучение процесса биосинтеза кормовых аминокислот на среде из соевой мелассы с использованием штаммов бактерий рода *Corynebacterium glutamicum*.

### Объекты и методы исследований

Одним из объектов исследований являются микроорганизмы *Corynebacterium glutamicum* В-1002, В-1722, В-2306.

*C. glutamicum* представляют собой неподвижные клетки, которые имеют палочковидную форму с булавовидными вздутиями, по окраске по Граму — грамположительные. Споры не образуют. При росте на твердой агаризованной среде через 2—4 суток роста образуют колонии диаметром 2—4 мм, белого или кремового цвета, поверхность гладкая, край ровный, текстура однородная. Тип дыхания — аэробный.



Штаммы *S. glutamicum* В-1002, В-1722 и В-2306 использовали в качестве продуцента аминокислоты. Скошенную агаризованную среду в пробирках засевают густым штрихом в условиях асептики и инкубируют в течение 24 ч при температуре 30–32 °С.

Состав питательного агара на 100 мл: пептон мясной ферментивный – 0,21 г, агар микробиологический – 1,22 г, натрий хлористый – 0,65 г, глюкоза – 0,63 г, натрий фосфорнокислый двузамещенный – 0,35 г, калий фосфорнокислый однозамещенный – 0,06 г. Доводят дистиллированной водой до 100 мл. Нагревают до полного растворения агара, при наличии осадка фильтруют, рН доводят до 7,3 ( $\pm 0,1$ ), разливают по пробиркам и автоклавируют 20 мин при 121 °С, затем охлаждают до температуры 45–5 °С.

На основе этой культуры готовят на стерильной водопроводной воде суспензию плотностью  $10^8$  клеток на 1 мл (ориентировочно 8–10 мл воды на одну пробирку). Полученной суспензией засевают стерильную питательную среду в качалочных колбах. Посевные колбы выдерживают на качалках в течение суток при температуре 30 °С.

При подготовке инокулята происходит ступенчатое увеличение биомассы. Поэтому могут использоваться один или несколько инокуляторов, возрастающих по объему. При периодическом способе получения посевной культуры независимо от количества стадий длительность выращивания продуцента на каждой стадии составляет 16–24 ч.

Второй способ – непрерывное получения посевного материала. Обновление исходной культуры и первые этапы размножения культуры осуществляют в лабораторных условиях.

Выращивание культуры проводили на специальном лабораторном стенде в небольших аппаратах с автоматическим регулированием заданных параметров. Данный способ позволил значительно увеличить количество получаемой культуры и, следовательно, сократить время выращивания производственной культуры за счет увеличения дозы посевного материала.

Второй объект исследования – соевая меласса, концентрат экстрактивных веществ, выработанный в результате производства соевого белкового концентрата на предприятии по переработке сои ООО «Содружество Протеин», располагающемся на территории Калининградской области и входящем в группу компаний «Содружество-Соя».

Проба соевой мелассы, отобранная из концентратора, имела темно-коричневый цвет, высокую плотность, условная масса на объем определялась в пределах 1,1–1,3 г/мл согласно ISO 6883-2017 [8]. В продукте отсутствовал этанол, используемый в технологическом процессе производства соевого белкового концентрата. Содержание сухих веществ колебалось в пределах 60–68 %.

Культивирование проводили в колбах объемом 250 мл (100 мл среды), без перемешивания, в термостате при температуре 34 °С.

Для идентификации полученных штаммов проводилось микроскопирование и окраска по Грамму.

Для более детального изучения клеток микроорганизмов использовали микроскопирование с применением фиксированного препарата. Для этого брали мазок с колонии *S. glutamicum*, высушивали, окрашивали, наносили иммерсионное масло и микроскопировали.



Оптическая плотность — это мера непрозрачности вещества для световых лучей или мера пропускания света для прозрачных объектов и отражения непрозрачных. Измерение оптической плотности производилось на спектрофотометре SmartSpec Plus, США. Прибор представляет собой сканирующий настольный спектрофотометр, работающий в УФ/видимом диапазоне длин волн от 200 nm до 800 nm. Принцип действия основан на сравнении двух световых потоков: полного, соответствующего 100% коэффициента пропускания (нулю оптической плотности), и ослабленного при прохождении через исследуемый образец.

Определение сухих веществ (СВ) проводили при помощи цифрового рефрактометра Hanna HI 96801, предназначенного для измерения содержания сахара в водных растворах в % Брикс. HI96801 производит измерения с точностью  $\pm 0,2\%$  Брикс. Проводит измерения образцов на основе их показателя преломления. Показатель преломления является характеристикой поведения света при прохождении через образец. В зависимости от состава образца свет по-разному преломляется и отражается. Проецируя характеристики света на линейный датчик изображения, можно измерять показатель преломления образца, а полученное значение использовать для определения физических свойств образца, таких как концентрация и плотность.

Измерение pH среды производилось с помощью pH метра Checher pH Tester HI 98103. Данный прибор обеспечивает быстрые и точные показания от 0 до 14 pH с разрешением 0,1 pH, точность  $\pm 0,2$ pH. pH-метр снабжен легко-читаемым жидкокристаллическим дисплеем и легко калибруется по двум точкам.

Качественный и количественный анализ аминокислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Хроматограф состоял из дегазатора, насоса, автосемплера, колонки и детектора. Пробы разводили в воде, с добавлением внутреннего стандарта, далее фильтровали в вialу и помещали в ячейку автосемплера. Результатом анализа являлись хроматограммы, по площадям пиков рассчитывалось количество аминокислот. В работе использовали жидкостный хроматограф LC-20AB «Shimadzu» с двойным насосом, автосемплером и диодно-матричным детектором. Использовалась колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6x150 mm, 5 $\mu$ m (Agilent), осуществлялся градиентный режим элюирования с метанолом и ацетатом натрия при температуре 35 °C, аналитическая длина волны 338 nm, объем пробы составлял 5 мкл.

### Результаты и их обсуждение

Для проведения оценки количественного содержания аминокислот в исходном образце соевой мелассы был проведен хроматографический анализ контрольного образца. На образце концентрированной соевой мелассы, отобранном на предприятии ООО «Содружество-Протеин», было измерено содержание сухих веществ на рефрактометре Hanna HI 96801. Оно составило 63 %, условная масса на объем от 1,247 г/мл определена согласно ISO 6883—2017 [8] Замер содержания этанола производился на ареометре, содержание данного вещества 0,0 %.



Проба для проведения хроматографического анализа разбавлялась дистиллированной водой, центрифугировалась и отфильтровывалась. Градуировочные графики получены на стандартном образце (Sigma Aldrich) смеси аминокислот. Сравнение по выходу аминокислот проводили по стандартному образцу аминокислот, хроматограмма стандартного образца представлена на рисунке 1, хроматограмма исследуемого контрольного образца соевой мелассы – на рисунке 2, результаты хроматографического анализа – в таблице 1.

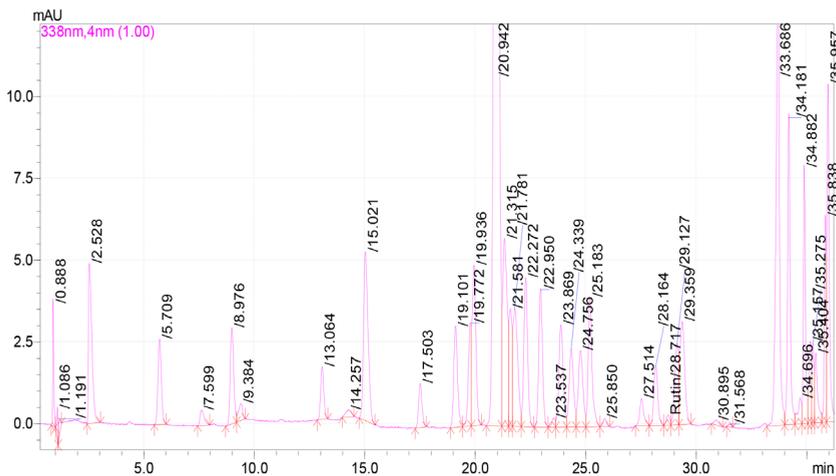


Рис. 1. Хроматограмма стандартного образца аминокислот

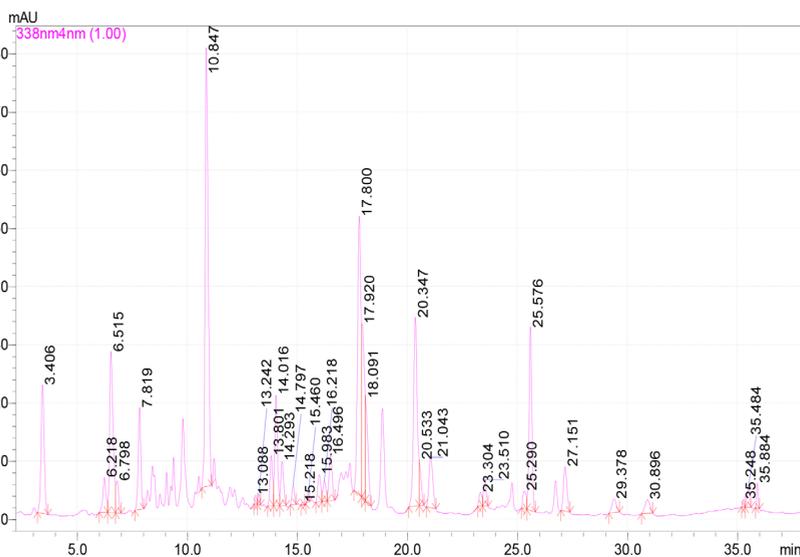


Рис. 2. Хроматограмма контрольного образца соевой мелассы



Таблица 1

**Расчетные значения содержания аминокислот в контрольном образце соевой мелассы по результатам хроматографического анализа**

Аминокислота	Содержание в контрольном образце, мкг/мл
1. Аспарагиновая кислота	12,3
2. Глутаминовая кислота	54,0
3. Серин	19,4
4. Глицин	11,14
5. Гистидин	51,05
6. Треонин	7,82
7. Аланин	25,04
8. Метионин	13,85
9. Фенилаланин	26,20
10. Лейцин и изолейцин	19,02
11. Лизин	4,05

74

Далее проводили эксперимент по сравнению культивирования бактерий *S. glutamicum* на синтетической среде и среде из соевой мелассы с разными ее концентрациями.

Используемая в опыте соевая меласса обладает высокой вязкостью и плотностью. Исходное значение содержания сухих веществ в образце колебалось в пределах 50–60%. Данное значение превышает необходимую концентрацию для оптимального роста культуры, экономически выгодную по содержанию углеводов (6–12%) для развития *S. glutamicum*, что может отрицательно влиять на рост культуры и нести неоправданно высокие экономические затраты. Поэтому для проведения опыта необходимо произвести разбавление мелассы и подобрать оптимальную ее концентрацию по содержанию сухих веществ. Для разбавления мелассы использовалась дистиллированная вода.

В ходе опыта были составлены 4 варианта жидких сред объемом 100 мл.

1. Синтетическая среда – пептон (0,5 г), NaCl (0,5 г), дрожжи (0,25 г), вода дистиллированная;

2. Меласса соевая + вода дистиллированная (25/75 %);

3. Меласса соевая + вода дистиллированная (15/85 %);

4. Меласса соевая + вода дистиллированная (10/90 %).

В составленных средах производился замер содержания сухих веществ и рН среды.

Подготовленные среды стерилизовали путем автоклавирования (стерилизация насыщенным паром под давлением) в течение 20 мин, затем среда остужалась до комнатной температуры. Посевной материал, выращенный на скошенных средах, переносился в жидкую среду в ламинарном боксе, обеспечивающем стерильные условия для исключения контаминации изучаемых образцов. Для переноса посевного материала использовалась пипетка одноканальная переменного объема Термо Фишер Сайентифик Лайт 1–10 мкл.

Далее культуральная жидкость помещалась в термостат с постоянной температурой 34 °С. Культивирование проводилось без перемешивания и без дополнительного подсвечивания. Контрольные замеры производились через 72 и 144 ч (табл. 2).

Результаты культивирования *S. glutamicum* на синтетической среде

Образец	СВ в начале культивиро- вания, %	Время культивирования, ч					
		72			144		
		СВ, %	Обсе- менность, cell/ml	Плотность, кг/м <sup>3</sup>	СВ, %	Обсе- менность, cell/ml	Плотность, кг/м <sup>3</sup>
<i>Штамм В-1002</i>							
1.1	3,9	4,3	$7,6 \cdot 10^8$	1,512	4,3	$9,8 \cdot 10^8$	1,953
1.2	13,8	16,0	$2,0 \cdot 10^9$	4,000	16,5	$2,0 \cdot 10^9$	4,000
1.3	10,4	12,1	$2,0 \cdot 10^9$	4,000	11,9	$2,0 \cdot 10^9$	4,000
1.4	8,1	8,7	$2,0 \cdot 10^9$	3,889	8,7	$2,0 \cdot 10^9$	4,000
<i>Штамм В-1722</i>							
2.1	2,6	3,2	$7,2 \cdot 10^8$	1,447	3,2	$7,9 \cdot 10^8$	1,580
2.2	16,4	17,3	$2,0 \cdot 10^9$	4,000	18,5	$2,0 \cdot 10^9$	4,000
2.3	9,4	10,6	$2,0 \cdot 10^9$	4,000	10,8	$2,0 \cdot 10^9$	4,000
2.4	6,7	7,3	$1,9 \cdot 10^9$	3,723	7,3	$2,0 \cdot 10^9$	4,000
<i>Штамм В-2306</i>							
3.1	2,9	3,2	$4,6 \cdot 10^8$	0,911	2,9	$5,9 \cdot 10^8$	1,170
3.2	16,5	17,4	$2,0 \cdot 10^9$	4,000	18,2	$2,0 \cdot 10^9$	4,000
3.3	9,5	10,7	$2,0 \cdot 10^9$	4,000	11,9	$2,0 \cdot 10^9$	4,000
3.4	6,6	6,7	$2,0 \cdot 10^9$	4,000	6,9	$2,0 \cdot 10^9$	4,000

Исходя из табличных данных видно, что обсемененность на синтетической среде ниже, чем на средах из соевой мелассы. За 72 ч обсемененность синтетической среды штамма 1002 составила  $7,6 \cdot 10^8$  cell/ml, рост содержания сухих веществ составил 10 % от исходного значения, с 3,9 до 4,3 %. На среде из соевой мелассы обсемененность за 72 ч составила  $2 \cdot 10^9$  cell/ml, с наибольшим ростом значения сухих веществ на соевой мелассе с наименьшим разбавлением и составило 15,9 % от исходного значения, с 13,8 до 16,0 %. За 144 часа значение обсемененности на соевой мелассе осталось неизменным, содержание сухих веществ изменилось незначительно. На синтетической среде отмечается рост обсемененности до  $9,8 \cdot 10^8$  cell/ml, без изменения содержания сухих веществ.

За 72 ч обсемененность синтетической среды штамма 1722 составила  $7,2 \cdot 10^8$  cell/ml, рост содержания сухих веществ составил 23 % от исходного значения, с 2,6 до 3,2 %. На среде из соевой мелассы обсемененность за 72 ч составила  $2 \cdot 10^9$  cell/ml, а на среде с наибольшим разбавлением –  $1,9 \cdot 10^9$  cell/ml, с наибольшим ростом значения сухих веществ на соевой мелассе с разбавлением 15/85 % и составило 12,7 % от исходного значения, с 9,4 до 10,6 %. За 144 ч значение обсемененности на синтетической среде выросло до  $7,9 \cdot 10^8$  cell/ml, содержание сухих веществ не изменилось. На средах из соевой мелассы в двух пробах значение обсемененности осталось неизменным, на среде с максимальным разведением достигло  $2 \cdot 10^9$  cell/ml, наибольший прирост по содержанию сухих веществ прослеживается в образце с наименьшим разбавлением.

За 72 ч обсемененность синтетической среды штамма 2306 составило  $4,6 \cdot 10^8$  cell/ml, рост содержания сухих веществ незначительный, за 144 ч



наблюдается уменьшение содержания сухих веществ при увеличении обсемененности до  $5,9 \cdot 10^8$  cell/ml. На среде из соевой мелассы обсемененность за 72 ч составила  $2 \cdot 10^9$  cell/ml с наибольшим ростом значения сухих веществ на соевой мелассе с разбавлением 15/85 % и составила 12,6 %; с разбавлением 9,5 до 10,7 % на этом образце наблюдается наибольший рост значения сухих веществ за 144 ч.

Штаммы *S. glutamicum* В-1002 и В-1722 имеют больший по сравнению со штаммом В-2306 прирост по содержанию сухих веществ на всех средах.

Исходя из данных первого опыта видно, что химический состав соевой мелассы для культивирования бактерий *S. glutamicum* является оптимальным, содержание сухих веществ в ней растет во время культивации.

Изменение концентрации соевой мелассы не имеет видимого влияния на обсемененность среды.

Следующим этапом эксперимента является подборка питательной среды из соевой мелассы с добавлением дополнительных источников питания для увеличения роста численности бактерий в среде.

Для данного этапа эксперимента были составлены 4 варианта жидких сред для культивирования выбранных штаммов *S. glutamicum* В-1002 и В-1722. Объем сред 100 мл.

1. Меласса соевая + вода дистиллированная (75/25 %).
2. Меласса соевая + вода дистиллированная (75/25 %) + NaCl 5 г.
3. Меласса соевая + вода дистиллированная (75/25 %) + никотиновая кислота 0,1 мл.
4. Меласса соевая + вода дистиллированная + NaCl + никотиновая кислота (75/25 %) + 5 г + 0,1 мл.

В составленных средах производился замер содержания сухих веществ и pH среды.

Подготовленные среды стерилизовались путем автоклавирования (стерилизация насыщенным паром под давлением) в течении 20 мин, затем среда остужалась до комнатной температуры.

Посевной материал, выращенный на скошенных средах, переносился в жидкую среду в ламинарном боксе, обеспечивающем стерильные условия для исключения контаминации изучаемых образцов. После среды с перенесенной культурой помещается в термостат с постоянной температурой 30 °С. Культивирование проводилось без перемешивания и без дополнительного подсвечивания.

Результаты измерений показателей приведены в таблице 3.

Таблица 3

**Результаты культивирования *S. glutamicum* на среде из соевой мелассы с добавлением дополнительных источников питания**

Образец	СВ в начале культивирования, %	Время культивирования, ч			
		72		144	
		СВ, %	Обсемененность, cell/ml	СВ, %	Обсемененность, cell/ml
<i>Штамм В-1002</i>					
1	22,6	24,8	$2,0 \cdot 10^9$	21,6	$2,0 \cdot 10^9$
2	23,0	23,3	$2,0 \cdot 10^9$	23,4	$2,0 \cdot 10^9$



Образец	СВ в начале культивирования, %	Время культивирования, ч			
		72		144	
		СВ, %	Обсемененность, cell/ml	СВ, %	Обсемененность, cell/ml
3	22,8	22,5	$2,0 \cdot 10^9$	23,4	$2,0 \cdot 10^9$
4	23,1	23,5	$2,0 \cdot 10^9$	19,2	$2,0 \cdot 10^9$
<i>Штамм В-1722</i>					
1	21,4	23,7	$2,0 \cdot 10^9$	24,0	$2,0 \cdot 10^8$
2	21,8	23,4	$2,0 \cdot 10^9$	23,2	$2,0 \cdot 10^9$
3	20,5	24,3	$2,0 \cdot 10^9$	24,8	$2,0 \cdot 10^9$
4	23,0	23,4	$2,0 \cdot 10^9$	24,5	$2,0 \cdot 10^9$

В результате полученных данных видно, что на всех жидких средах оба штамма имеют идентичную обсемененность, из чего можно сделать вывод что выбранные дополнительные источники питания значимой роли в развитии бактерий *S. glutamicum* на среде из соевой мелассы, при разбавлении ее дистиллированной водой в соотношении 1 : 3, не играют.

Анализируя изменение концентрации сухих веществ на штамме В-1002, можно увидеть, что в среде без добавления солей и витаминов содержание сухих веществ на третьи сутки выросло на 9,7 % с 22,6 до 24,8 %, но за 144 ч концентрация сухих веществ уменьшилась до 21,6 %. В среде с добавлением NaCl значительных изменений в содержании сухих веществ нет. На третьи сутки содержание сухих веществ выросло на 1,3 %, а за 144 ч на 1,7 % от исходного значения. На среде с добавлением витаминов за 72 ч содержание сухих веществ уменьшилось на 0,99 %, а за 144 ч выросло на 2,6 % от исходного значения. На среде с добавлением солей и витаминов концентрация сухих веществ за 72 ч выросла на 1,7 %, а за 144 ч уменьшилась на 16,9 % от исходного значения. Можно сделать вывод, что внесение дополнительных источников питания на развитие *S. glutamicum* В-1002 в среде из соевой мелассы явного влияния не имеет. Но внесение дополнительных элементов питания влияет на содержание сухих веществ, что может быть связано с концентрацией продуктов метаболизма. Графически данные представлены на рисунке 3.

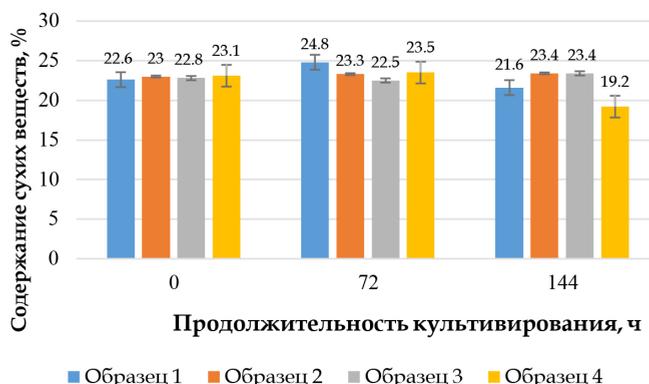


Рис. 3. Зависимость содержания сухих веществ в исследуемых образцах в зависимости от продолжительности культивирования штамма В-1002

При культивировании *S. glutamicum* штамм В-1722 на среде из соевой мелассы разбавленной дистиллированной водой в соотношении 1:2 наблюдается рост содержания сухих веществ за 72 ч на 10,8 %, а за 144 ч 12,2 % от исходного содержания. На среде с добавлением NaCl наблюдался рост сухих веществ на 7,3 % за 72 ч от исходного содержания, и за 144 ч рост от исходного значения составил 6,4 %.

В среде с добавлением витаминов рост сухих веществ составил 18,5 % за 72 ч и 20,9 % за 144 ч по отношению к исходной концентрации. На среде с добавлением NaCl и витамина содержание сухих веществ за 72 ч выросло незначительно, на 1,7 %, а за 144 ч на 6,5 % по отношению к исходной концентрации сухих веществ.

Наибольший рост сухих веществ наблюдается в среде с добавлением витамина. Графически данные представлены на рисунке 4.

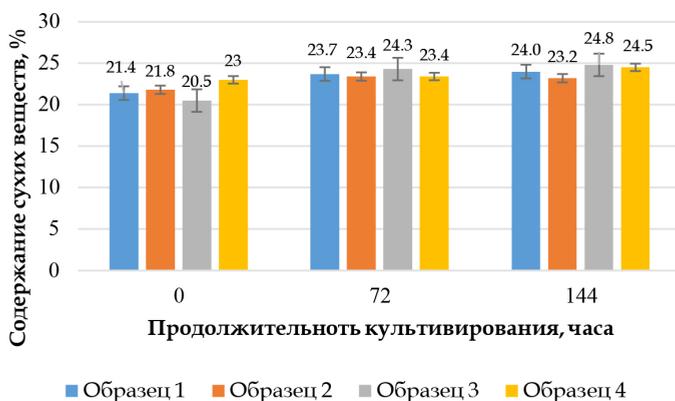


Рис. 4. Зависимость содержания сухих веществ в исследуемых образцах в зависимости от продолжительности культивирования штамма В-1722

Рост содержания сухих веществ в культуральной жидкости свидетельствует о процессах метаболизма, происходящих в результате роста численности бактерий *S. glutamicum*. В зависимости от штамма добавление NaCl и витамина по-разному повлияло на концентрацию сухих веществ в ходе культивирования в течение 72 и 144 ч, что обусловлено особенностью усвоения и переработки веществ выбранными штаммами.

После культивирования микроорганизмов в течение 144 ч был произведен анализ на содержание аминокислот в исследуемых образцах мелассы, разбавленной дистиллированной водой 1:3 без добавления солей и витаминов.

Идентифицировали аминокислоты по временам удерживания. Концентрацию аминокислот рассчитывали по градуировочным графикам зависимости площади пика аминокислот от концентрации.

Градуировочные графики получены на стандартном образце (Sigma Aldrich) смеси аминокислот. Хроматограмма стандартной смеси аминокислот показана на рисунке 5.

Времена удерживания нескольких аминокислот приведены в таблице 4, экспериментальные данные для получения линейных градуировочных зависимостей аминокислот — в таблице 5.

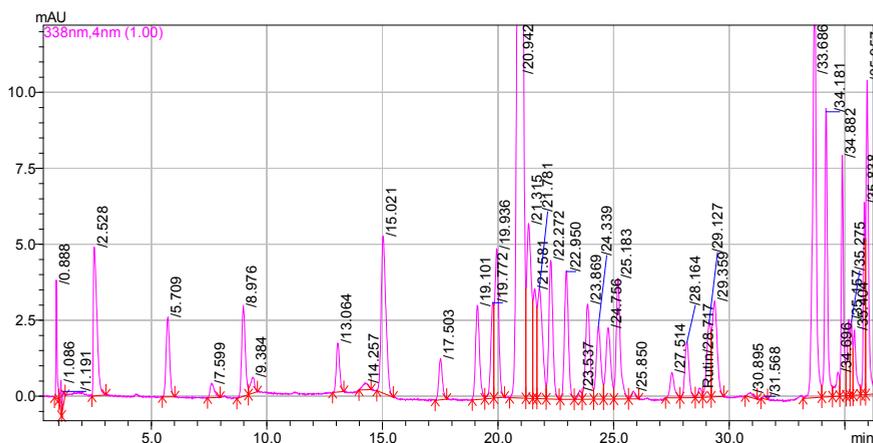


Рис. 5. Хроматограмма стандартного образца аминокислот

Таблица 4

**Время выхода аминокислот в стандартном образце**

Аминокислота	Время выхода аминокислоты, мин
1. Аспарагиновая кислота	5,80
2. Глутаминовая кислота	8,92
3. Серин	14,00
4. Глицин	17,72
5. Аланин	23,78
6. Аргинин	24,13
7. Лизин	35,73

Таблица 5

**Концентрация и площадь пика аминокислот в стандартном образце**

Аминокислота	Концентрация аминокислот, нмоль/мл	Площадь пика, отн. ед.
1. Аспаргиновая кислота	50	15 594
	100	30 772
	150	54 251
	200	68 654
2. Глутаминовая кислота	50	17 218
	100	34 956
	150	53 393
	200	73 274
3. Серин	50	42 198
	100	77 689
	150	108 712
	200	153 265



Аминокислота	Концентрация аминокислот, нмоль/мл	Площадь пика, отн. ед.
4. Глицин	50	20700
	100	40348
	100	41024
	150	57304
	200	74614
5. Аланин	200	76018
	100	43605
	100	40240
	150	65432
6. Аргинин	200	91366
	50	17953
	100	35766
	100	35533
	150	49459
7. Лизин	200	65389
	200	70293
	10	7728
	20	14504
	50	36162
7. Лизин	100	68313
	200	137705

Для хроматографического анализа пробы мелассы разбавлялись в 2 раза и центрифугировались для отделения осадка, затем пробы дополнительно отфильтровывались. Хроматограммы культуральной жидкости представлены на рисунке 6 и 7, площади идентифицированных аминокислот — в таблице 6.

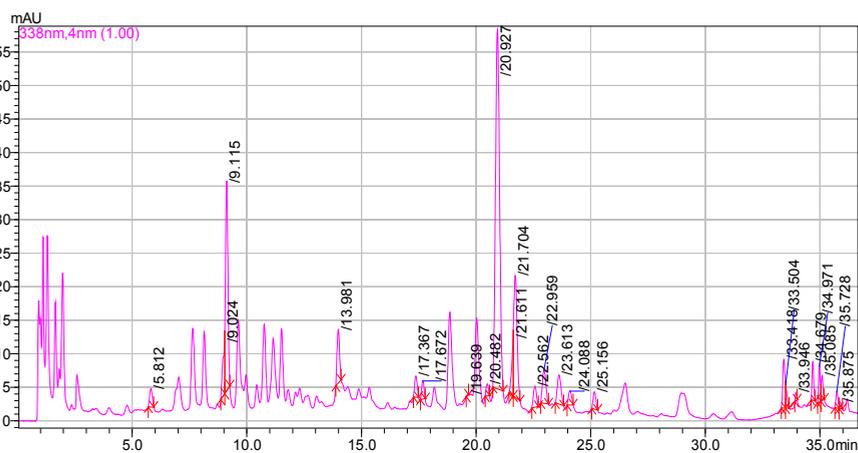


Рис. 6. Хроматограмма выхода аминокислот на соевой мелассе с культивированием *S. glutamicum* штамм В-1001

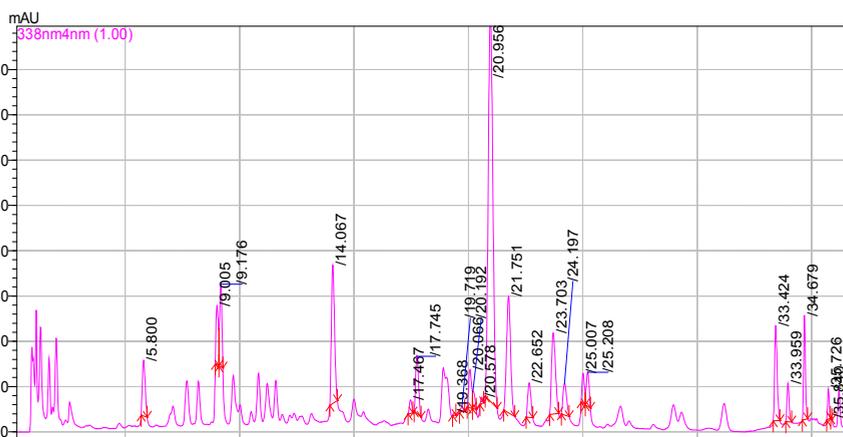


Рис. 7. Хроматограмма выхода аминокислот на соевой мелассе с культивированием *C. glutamicum* штамм В-1722

Таблица 6

**Площади пиков аминокислот в пробах соевой мелассы**

Аминокислота	Площадь пика аминокислоты в мелассе, отн. ед.	
	<i>C. glutamicum</i> В-1001	<i>C. glutamicum</i> В-1722
1. Аспарагиновая кислота	21 951	104 685
2. Глутаминовая кислота	49 587	93 839
3. Серин	60 495	287 394
4. Глицин	19 374	111 726
5. Аланин	48 833	212 109
6. Аргинин	19 577	76 508

Исходя из данных, полученных путем определения содержания аминокислот методом жидкостной хроматографии, было установлено, что бактерии *C. glutamicum* способны синтезировать аминокислоты на субстрате, состоящем из соевой мелассы.

Используя уравнения, полученные при помощи построения градуировочных графиков, на основе данных контрольного образца были рассчитаны концентрации, содержащиеся в культуральной жидкости с площадями пика по каждому штамму (табл. 7).

Таблица 7

**Расчетные значения концентрации аминокислот в культуральной жидкости, продуцируемые штаммами *C. glutamicum* В-1002 и В-1722**

Аминокислота	Площадь пика аминокислоты в мелассе, отн. ед.		Расчетное значение концентрации аминокислоты, нмоль/мл	
	В-1002	В-1722	В-1002	В-1722
1. Аспарагиновая кислота	21951	104685	69,25	295,72
2. Глутаминовая кислота	49587	93839	138,10	256,64



Аминокислота	Площадь пика аминокислоты в мелассе, отн. ед.		Расчетное значение концентрации аминокислоты, нмоль/мл	
	В-1002	В-1722	В-1002	В-1722
3. Серин	60495	287394	1,54	7,77
4. Глицин	19374	111726	43,08	301,18
5. Аланин	48833	212109	112,01	462,98
6. Аргинин	19577	76508	53,38	227,42
7. Лизин	1716	14203	0,99	19,30

82

Исходя из данных, представленных в таблице 7, можно сделать вывод о том, что для штамма В-1001 наибольшую концентрацию из определенных аминокислот составила глутаминовая кислота (равна 138,1 нмоль/л), а наименьшая концентрация серина – 1,54 нмоль/л. Для штамма В-1722 наибольшую концентрацию составила аминокислота аланин (462,98 нмоль/л), а наименьшая концентрация аминокислоты серин равна 7,77 нмоль/л.

По концентрации синтезированных аминокислот видно, что штамм *S. glutamicum* В-1722, культивируемый на одинаковых средах, в одинаковых условиях имеет более высокую продуктивность, чем штамм *S. glutamicum* В-1002.

Так, содержание аспаргиновой кислоты для штамма В-1722 по сравнению со штаммом В-1002 больше в 4,3 раза, глутаминовой кислоты – в 1,9 раз, серина – в 5 раз, глицина – в 7 раз, аланина – в 4,1 раза, аргинина – в 4,3 раза, лизина – в 19 раз. Следовательно, культивирование *S. glutamicum* штамм В-1722 может быть экономически выгодно при получении аминокислот. Для проведения оценки полученного количества аминокислот были проведены расчеты, результаты которых представлены в таблице 8.

Таблица 8

**Расчетное значение аминокислот в культуральных жидкостях,  
продуцируемых *S. glutamicum* штаммами В-1001 и В-1722**

Аминокислота	Штамм <i>S. glutamicum</i> В-1001, мкг/мл	Штамм <i>S. glutamicum</i> В-1722, мкг/мл
1. Аспарагиновая кислота	18,434	78,720
2. Глутаминовая кислота	40,619	75,503
3. Серин	16,184	81,657
4. Глицин	6,470	45,238
5. Треонин	следы	8,383
6. Аланин	19,960	82,502
7. Аргинин	18,596	79,233
8. Тирозин	21,503	49,928
9. Метионин	5,067	
10. Валин	2,787	10,290
11. Триптофан	38,473	118,049



Аминокислота	Штамм <i>C. glutamicum</i> В-1001, мкг/мл	Штамм <i>C. glutamicum</i> В-1722, мкг/мл
12. Фенилаланин	23,284	95,555
13. Изолейцин	24,268	
14. Лейцин	13,090	
15. Лизин	5,640	28,706

По анализу данных аминокислот, идентифицированных хроматографическим методом, можно сделать вывод, что бактерии рода *C. glutamicum* способны синтезировать широкий спектр аминокислот на среде, состоящей из соевой мелассы.

Далее для эксперимента были приняты следующие разведения: соевая меласса + дистиллированная вода в соотношении 2:8 и соевая меласса + дистиллированная вода в соотношении 1:9. Данные разведения соответствуют требованиям технологии культивирования *C. glutamicum* по содержанию сухих веществ в среде в диапазоне 6–15 %.

В среды дополнительно вводился 2 % раствор гидроксида натрия для установления различных уровней рН в исходных средах. Оптимальный уровень рН при культивировании бактерий рода *C. glutamicum* находился в диапазоне 6–7 ед.

На данном этапе проверялась теория влияния рН среды на потребление сухих веществ бактериями и их влияния на изменение рН в культуральной жидкости в начале культивирования.

Исходные показатели питательных сред из соевой мелассы представлены в таблице 9.

Таблица 9

## Исходные показатели питательных сред из соевой мелассы

Среда	Содержание сухих веществ, %	Исходное значение рН	Количество добавленного 2 %-ного NaOH, мл	рН после добавления 2 %-ного NaOH
<i>Разведение 1:9</i>				
Образец 1: соевая меласса + дистиллированная вода	10,7	5,7	–	5,7
Образец 2: соевая меласса + дистиллированная вода	10,6		4,0	6,5
Образец 3: соевая меласса + дистиллированная вода	10,6		5,0	7,0
<i>Разведение 2:8</i>				
Образец 4: соевая меласса + дистиллированная вода	15,3	5,6	–	5,6
Образец 5: соевая меласса + дистиллированная вода	15,5		6,2	6,5
Образец 6: соевая меласса + дистиллированная вода	15,4		7,0	7,0



Подготовленные среды стерилизуются путем автоклавирования (стерилизация насыщенным паром под давлением) в течение 20 мин, затем среда остывает до комнатной температуры.

Посевной материал, выращенный на скошенных средах, переносится в жидкую среду в ламинарном боксе, обеспечивающем стерильные условия для исключения контаминации изучаемых образцов. После среды с перенесенной культурой он помещается в термостат с постоянной температурой 30 °С. Культивирование проводится без перемешивания и без дополнительного подсвечивания. Контрольные измерения СВ и pH производились через 72 и 144 ч, результаты измерений представлены в таблицах 10 и 11.

Таблица 10

**Значения показателей СВ и pH в культуральной жидкости при разведении соевой мелассы 1:9**

Среда	72 ч		144 ч	
	СВ, %	pH	СВ, %	pH
Образец 1: соевая меласса + дистиллированная вода	8,4	4,4	9,6	4,5
Образец 2: соевая меласса + дистиллированная вода	10,2	4,5	10,1	4,5
Образец 3: соевая меласса + дистиллированная вода	9,0	4,5	9,0	4,6

Таблица 11

**Значения измеряемых показателей в культуральной жидкости при разведении соевой мелассы 2:8**

Среда	72 ч	144 ч	72 ч	144 ч
	СВ, %		pH	
Образец 4: соевая меласса + дистиллированная вода	16,6	4,6	16,6	4,7
Образец 5: соевая меласса + дистиллированная вода	14,5	4,8	15,3	4,7
Образец 6: соевая меласса + дистиллированная вода	12,5	4,9	15,0	4,9

Анализ табличных данных показал, что на образце 1 отмечается уменьшение сухих веществ при культивировании в течение 72 ч, их содержание уменьшилось на 21,5 % по отношению к исходному, с 10,7 до 8,4 %, рост концентрации сухих веществ наблюдается с 72 ч к 144 ч, и составляет 14,3 % от значения за 72 ч.

При исследовании образца 2 прослеживается уменьшение сухих веществ за 72 ч на 4 % от исходного значения, с 10,6 %, до 10,2 %, и продолжается к 144 ч, составив 10,1 % сухих веществ.

При исследовании образца 3 потребление сухих веществ за 72 ч составило 16 % от исходного значения и изменилось с 10,6 до 9,0 %. При замере показаний через 144 ч содержание сухих веществ не изменилось. Графические данные представлены на рисунке 8.



Во всех образцах наблюдается изменения показателя рН в сторону кислой среды.

Из табличных данных видно, что в образце 4 содержание сухих веществ выросло за 72 ч на 8,5 %, с 15,3 до 16,6 %. При продолжении опыта через 144 ч содержание сухих веществ осталось на уровне, соответствующем 72 ч.

В пробе с образцом 5 наблюдается потребление микроорганизмами сухих веществ через 72 ч, их содержание уменьшилось на 6,5 % относительно первоначального значения, с 15,5 до 14,5 %. Через 144 ч наблюдается увеличение содержания сухих веществ по отношению к данным за 72 ч на 5,5 %, с 14,5 до 15,3 % сухих веществ, но относительно исходного значения сухих веществ их значение уменьшилось на 1,3 %.

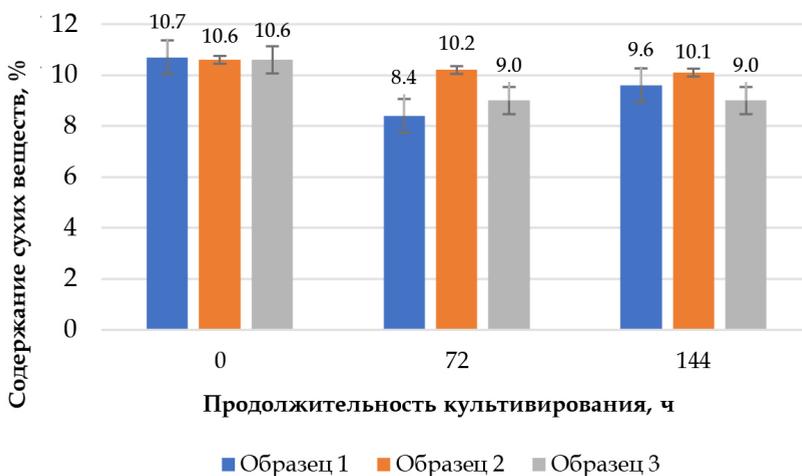


Рис. 8. Зависимость содержания сухих веществ в исследуемых образцах при разведении 1:9 с разным исходным значением рН в зависимости от продолжительности культивирования

В образце 6 наблюдается уменьшение содержания сухих веществ через 72 ч на 18,8 %, с 15,4 до 12,5 %. Через 144 ч содержание сухих веществ увеличилось на 12 % относительно значения, соответствующего 72 ч, а относительно исходных данных содержание сухих веществ уменьшилось на 2,6 %, с 15,4 до 15,0 % сухих веществ в пробе. Графические данные представлены на рисунке 9.

Во все пробах показатель рН сдвинулся в кислую сторону. Наибольшее изменение рН среды наблюдается в образце 6 — изменилось с нейтральной на кислую.

На основе из анализа данных можно сделать вывод, что наибольшие изменения в концентрации сухих веществ наблюдались для образцов 1 и 6.

Значения оптической плотности анализируемых образцов представлены в таблице 12. Длина волны для анализа составляла 1000 нм.

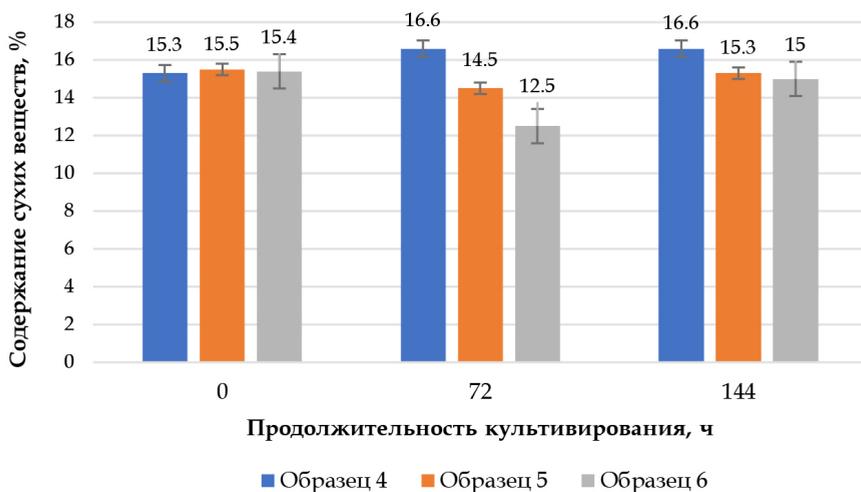


Рис. 9. Зависимость содержания сухих веществ в исследуемых образцах при разведении 2:8 с разным исходным значением рН в зависимости от продолжительности культивирования

Таблица 12

**Значения оптической плотности анализируемых образцов культуральных жидкостей**

Образец	Оптическая плотность		
	0 ч	72 ч	144 ч
<i>Разведение 1:9</i>			
Образец 1	1,12	1,44	1,76
Образец 2		1,50	1,76
Образец 3		1,61	1,82
<i>Разведение 2:8</i>			
Образец 4	1,15	1,36	1,56
Образец 5		1,67	2,00
Образец 6		1,39	1,67

Из полученных данных видно, что оптическая плотность в образцах увеличивалась в течение культивирования, что может свидетельствовать об увеличении количества бактерий в культуральной жидкости. В образце 1 оптическая плотность увеличилась на 28,6 % за 72 ч по отношению к исходному значению, и за 144 ч на 57,0 % к исходному значению. Оптическая плотность образцов, культивируемых 72 ч, увеличилась на 22 % через 144 ч культивирования.

В образце 2 за 72 ч оптическая плотность увеличилась на 31,6 % от исходного значения, а за 144 ч — на 57,0 %. Относительно культивирования в течение 72 ч к 144 ч оптическая плотность увеличилась на 17,3 %.

В образце 3 за 72 ч оптическая плотность увеличилась на 43,8 % от исходного значения, а за 144 ч — на 62,5 %. Относительно культивирования в течение 72 ч к 144 ч оптическая плотность увеличилась на 13,0 %.



В образце 4 за 72 ч оптическая плотность увеличилась на 18,3 % от исходного значения, а за 144 ч — на 35,7 %. Относительно культивирования в течение 72 ч к 144 ч оптическая плотность увеличилась на 14,7 %.

В образце 5 за 72 ч оптическая плотность увеличилась на 45,2 % от исходного значения, а за 144 ч — на 73,9 %. Относительно культивирования в течение 72 ч к 144 ч оптическая плотность увеличилась на 19,7 %.

В образце 6 за 72 ч оптическая плотность увеличилась на 20,9 % от исходного значения, а за 144 ч — на 45,2 %. Относительно культивирования в течение 72 ч к 144 ч оптическая плотность увеличилась на 20,1 %.

После продолжительности культивирования 144 ч производился анализ содержания аминокислот в исследуемых образцах хроматографическим методом. Для хроматографического анализа пробы мелассы разбавлялись в 2 раза и центрифугировались для отделения осадка, затем пробы дополнительно отфильтровались. Идентифицировали аминокислоты по временам удерживания. Концентрацию аминокислот рассчитывали по градуировочным графикам зависимости площади пика аминокислот от концентрации. Градуировочные графики были получены на стандартном образце (Sigma Aldrich) смеси аминокислот. Результаты расчетов содержания аминокислот в культуральной жидкости представлены в таблицах 13 и 14.

Таблица 13

**Содержание аминокислот в исследуемых образцах при разведении 1:9**

Время выхода, мин	Аминокислота, мкг/мл	Образец 1	Образец 2	Образец 3
2,3	Аспарагиновая кислота	52,92	80,86	81,89
4,2	Глутаминовая кислота	109,20	153,32	118,03
9,5	Серин	94,26	133,22	105,36
12,4	Глицин и гистидин	33,02	34,62	31,42
12,9	Треонин	19,57	28,85	26,73
15,9	Аланин	13,46	12,99	21,70
24,5	Метионин	36,21	46,07	42,02
25,5	Фенилаланин	11,60	21,50	16,44
27,0	Лейцин и изолейцин	54,86	52,03	40,93
35,3	Лизин	10,25	6,71	7,89

Таблица 14

**Содержание аминокислот в исследуемых образцах при разведении 2:8**

Время выхода, мин	Аминокислота, мкг/мл	Образец 4	Образец 5	Образец 6
	Аспарагиновая кислота	Не обнаружен		
2,3			62,17	25,52
4,2	Глутаминовая кислота	102,00	70,76	123,15
9,5	Серин	37,02	84,27	50,30
12,4	Глицин и гистидин	23,56	30,79	22,43
12,9	Треонин	6,40	21,35	8,98
15,9	Аланин	7,58	5,70	0,76
24,5	Метионин	21,72	42,14	18,06
25,5	Фенилаланин	7,42	13,27	4,18
27,0	Лейцин и изолейцин	36,52	50,17	18,06
35,3	Лизин	9,42	9,70	6,48



Сравнивая данные по аминокислотам в исходном образце соевой мелассы и после культивирования бактерии *S. glutamicum* штамма В-1722 на средах из соевой мелассы при исходном содержании сухих веществ 10,6 %, можно заметить, что в образце 1 содержание почти всех аминокислот по отношению к исходному значению концентраций в соевой мелассе выросло. Концентрации таких аминокислот, как аланин и фенилаланин, уменьшились, на 46,2 и 55,7 % соответственно. Содержание лизина увеличилось на 153,0 % — с 4,05 мкг/мл до 10,25 мкг/мл. Максимальное увеличение в ходе культивирования бактерии отмечается для серина, его концентрация в культуральной жидкости увеличилась на 385,9 % — с 19,4 мкг/мл до 94,26 мкг/мл.

В образце 2 содержание аминокислот, кроме аланина и фенилаланина, увеличилось. Концентрация аланина уменьшилась на 48,1 %, а фенилаланина — на 17,9 %. Содержание лизина относительно исходной концентрации увеличилось на 65,8 % — с 4,05 мкг/мл до 6,71 мкг/мл. Максимальное увеличение в ходе культивирования бактерии отмечается для серина, его концентрация в культуральной жидкости увеличилась — на 586,7 % и аспарагиновой кислоты, на 557,4 %.

В образце 3 также отмечается увеличение концентрации аминокислот, за исключением аланина и фенилаланина. Концентрация аланина уменьшилась на 13,3 %, а фенилаланина — на 37,2 %. Содержание лизина в образце 3 увеличилось на 94,9 % — до 7,89 мкг/мл с 4,05 мкг/мл. Максимальное увеличение в ходе культивирования бактерии отмечается для аспарагиновой кислоты, концентрация относительно контрольного образца увеличилась на 568,5 % — с 12,3 мкг/мл до 81,89 мкг/мл.

Сравнивая данные по аминокислотам в исходном образце соевой мелассы и данным по результатам культивирования бактерии *S. glutamicum* штамма В-1722 на средах из соевой мелассы при исходном содержании сухих веществ 15,4 % ± 0,1, можно заметить, что в образце 4 аспарагиновая кислота не обнаружена. Концентрация треонина, аланина и фенилаланина уменьшалась относительно значения в исходном образце мелассы на 18,1, 29,7 и 71,7 %, соответственно. Концентрация остальных аминокислот увеличилась. Наибольшее увеличение концентрации наблюдалось для лизина, его концентрация увеличилась на 132,6 % — с 4,05 мкг/мл до 9,42 мкг/мл.

В образце 5 наблюдалось увеличение концентрации аминокислот относительно контрольного образца, кроме аланина и фенилаланина. Концентрация аланина уменьшилась на 77,2 %, а фенилаланина — на 49,4 % от исходных значений. Наибольшее увеличение концентрации отмечается для аспарагиновой кислоты — с 12,3 мкг/мл до 62,7 мкг/мл, составив 405,5 %. Концентрация лизина увеличилась на 139,4 % — с 4,05 мкг/мл до 9,70 мкг/мл.

В образце 6 уменьшилась концентрация аланина на 97,0 %, фенилаланина — на 84,1 %, лейцина и изолейцина на 5,0 % от концентрации в исходном образце соевой мелассы. Содержание остальных аминокислот увеличилось. Наибольшее увеличение концентрации отмечено для серина — на 159,3 %, с 19,4 мкг/мл в исходном образце до 50,30 мкг/мл в культуральной жидкости. Концентрация лизина увеличилась — на 60 %, с 4,05 мкг/мл до 6,48 мкг/мл.



## Заключение

В ходе исследований были проанализированы отечественные и зарубежные источники по изучаемому вопросу и определены основные аспекты культивирования *Corynebacterium glutamicum* на среде, состоящей из соевой мелассы для получения кормовых аминокислот. Были рассмотрены различные позиции подготовки соевой мелассы для использования в качестве субстрата. Проанализированы полученные данные о возможности культивирования на различных концентрациях сред из соевой мелассы и необходимость добавления дополнительных элементов питания в среды.

При культивировании на среде из соевой мелассы штаммов *C. glutamicum* В-1002, В-1722, В-2306 выявлено что наименьшей способностью усваивать компоненты соевой мелассы обладает штамм В-2306.

Установлено, что добавление в качестве факторов роста никотиновой кислоты и NaCl не оказывало влияния на накопление биомассы штаммов В-1002 и В-1722.

При культивировании коринебактерий на соевой мелассе с различных технологических позиций был сделан вывод, что наилучшим вариантом является меласса, отобранная из концентратора, прошедшая весь технологический процесс. Она содержит максимальное количество необходимых компонентов.

В зависимости от исходных условий культивирования (рН и содержания сухих веществ) наблюдается рост концентрации кормовых аминокислот.

Для получения треонина наилучший вариант культивирования на среде из соевой мелассы с исходным содержанием сухих веществ 15,5 %, рН 6,5 при температуре 30 °С в течение 144 ч.

Для получения метионина наилучший вариант культивирования на среде из соевой мелассы с исходным содержанием сухих веществ 15,5 %, рН 6,5 при температуре 30 °С в течение 144 ч.

Для получения лизина наилучший вариант культивирования на среде из соевой мелассы с исходным содержанием сухих веществ 15,5 %, рН 5,6 при температуре 30 °С в течение 144 ч.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-316-60002 \ 19 от 22.08.2019).*

## Список литературы

1. Niwinska B., Witaszek K., Niedbala G., Pilarski K. Seeds of n-GM Soybean Varieties Cultivated in Poland and Their Processing Products as High-Protein Feeds in Cattle Nutrition // Agriculture. 2020. №10. <https://doi.org/10.3390/agriculture10050174>.
2. Niedbala G., Kurasiak-Popowska D., Piekutowska M. et al. Application of Artificial Neural Network Sensitivity Analysis to Identify Key Determinants of Harvesting Date and Yield of Soybean (*Glycine max* [L.]/Merrill) Cultivar Augusta // Agriculture. 2022. №12. P. 754. <https://doi.org/10.3390/agriculture12060754>.
3. Kumawat K., Waraich I., Nagpal S. et al. Co-inoculation of indigenous *Pseudomonas oryzae* and *Bradyrhizobium* sp. modulates the growth, symbiotic efficacy, nutrient acquisition and grain yield in soybean // Pedosphere. 2022. №32. P. 438–451. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60085-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60085-1).



4. CEN EN ISO 6883 – 2017 Animal and vegetable fats and oils – Determination of conventional mass per volume (litre weight in air) (ISO 6883:2017) – Жиры и масла животные и растительные. Определение условной массы на объем (вес литра в воздухе).

5. Janocha A., Milczarek A., Pietrusiak D. et al. Efficiency of Soybean Products in Broiler Chicken Nutrition // *Animals*. 2022. №12. <https://doi.org/10.3390/ani12030294>.

6. Świątkiewicz M., Witaszek K., Sosin E. et al. The Nutritional Value and Safety of Genetically Unmodified Soybeans and Soybean Feed Products in the Nutrition of Farm Animals // *Agronomy*. 2021. №11. P. 1105. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061105>.

7. Тильба В. А., Тишкоф Н. М. Биология сои: возможности оптимизации отдельных продукционных процессов Тильба // *Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур*. 2016. №3 (167). С. 78 – 87.

8. Официальный сайт группы компаний «Содружество». URL: <http://www.sodruzhestvo.ru/QiaTa> (дата обращения 15.07.2022).

9. Hasanuzzaman M., Parvin K., Anee T. et al. Salt Stress Responses and Tolerance in Soybean // *Plant Stress Physiology. Perspectives in Agriculture*. IntechOpen. 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102835>.

10. Serafin-Andrzejewska M., Helios W., Jama-Rodzeńska A. et al. Effect of Sowing Date on Soybean Development in South-Western Poland // *Agriculture*. 2021. №11. P. 413 – 424. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050413>.

11. Xiong R., Liu S., Considine M. et al. Root system architecture, physiological and transcriptional traits of soybean (*Glycine max* L.) in response to water deficit: A review // *Physiologia Plantarum*. 2021. №172. P. 405 – 418. <https://doi.org/10.1111/ppl.13201>.

12. Rakita S., Banjac V., Djuragic O. et al. Soybean Molasses in Animal Nutrition // *Animals*. 2021. №11. P. 514. <https://doi.org/10.3390/ani11020514>.

13. Pinotti L., Manoni M., Fumagalli F. et al. Reduce, reuse, recycle for food waste: A second life for fresh-cut leafy salad crops in animal diets // *Animals*. 2020. №10. P. 1 – 14. <https://doi.org/10.3390/ani10061082>.

14. Luciano A., Tretola M., Ottoboni M. et al. Potentials and challenges of former food products (food leftover) as alternative feed ingredients // *Animals*. 2020. №10. P. 125. <https://doi.org/10.3390/ani10010125>.

15. Van Cleef F., van Cleef E., Almeida M. et al. PSI-13 In vitro digestibility and gas production of diets containing different levels of soybean molasses for feedlot sheep // *J. Anim. Sci.* 2018. №96 (S3). P. 63. <https://doi.org/10.1093/jas/sky404.139>.

16. Campuzano S., Pelling A. Scaffolds for 3D Cell Culture and Cellular Agriculture Applications Derived From Non-animal Sources // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2019. №3. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00038>.

17. Takahashi M., Aoyagi H. Practices of shake-flask culture and advances in monitoring CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> // *Applied microbiology and biotechnology*. 2018. P. 102. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8922-8>.

18. Takahashi M., Sawada Y., Aoyagi H. Development of a circulation direct sampling and monitoring system for O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations in the gas-liquid phases of shake-flask systems during microbial cell culture // *AMB Express*. 2017. №7. P. 163. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0464-4>.



### Об авторах

Мария Игоревна Зимина – канд. техн. наук, научный сотрудник, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: mariia.zimina@list.ru

Светлана Юрьевна Носкова – канд. техн. наук, старший научный сотрудник, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: s\_noskova2022@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-1198-1951>

Елена Викторовна Ульрих – д-р техн. наук, заместитель директора Института агроинженерии и пищевых систем по научной и международной деятельности, Калининградский государственный технический университет, Россия.

E-mail: elen.ulrich@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4107-7277>

Кристина Сергеевна Афанасьева – младший научный сотрудник, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: udgen73@mail.ru

Наталья Сергеевна Федотовских – ЗАО «Содружество-Соя», Россия.

Ольга Владимировна Кригер – д-р техн. наук, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Россия.

E-mail: olgakrigr58@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1489-0716>

**M. I. Zimina<sup>1</sup>, S. Yu. Noskova<sup>1</sup>, E. V. Ulrich<sup>2</sup>  
K. S. Afanasyeva<sup>1</sup>, N. S. Fedotovskikh<sup>3</sup>, O. V. Krieger<sup>1</sup>**

### PECULIARITIES OF OBTAINING FODDER AMINO ACIDS WHEN CULTURING CORYNEBACTERIUM ON SOYBEAN MOLASSE

<sup>1</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

<sup>2</sup> Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia

<sup>3</sup> Closed Joint Stock Company Sodruzhestvo-Soya, Svetly, Russia

Received 02 August 2022

Accepted 29 August 2022

doi: 10.5922/gikbfu-2022-3-5

**To cite this article:** Zimina M. I., Noskova S. Yu., Ulrich E. V., Afanasyeva K. S., Fedotovskikh N. S., Krieger O. V. 2022, Peculiarities of obtaining fodder amino acids when culturing *Corynebacterium* on soybean melasse, *Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, №3. P. 68–92. doi: 10.5922/gikbfu-2022-3-5.



Currently, soybeans and soybean derivatives are widely used for food and animal feed. A significant content of carbohydrates in soy molasses makes it possible to use it as a component of a nutrient medium for cultivating microorganisms that produce feed amino acids. The aim of this work was to study the process of biosynthesis of feed amino acids on a soy molasses medium using bacterial strains of the genus *Corynebacterium glutamicum*. The following research methods were used: microscopy, spectrometry, refractometry, pH-metry and high-performance liquid chromatography. It has been established that when cultivating on soy molasses, the strains *C. glutamicum* B-1002 and *C. glutamicum* B-1722 have the greatest ability to assimilate the components of the medium. The addition of such growth components as nicotinic acid and NaCl had no significant effect on the accumulation of *C. glutamicum* B-1002 and *C. glutamicum* B-1722 biomass. It has been proven that the best medium for cultivation of *C. glutamicum* is molasse that has gone through the entire technological process and contains the maximum amount of components necessary for the cultivation of *C. glutamicum* and the production of feed amino acids. The production of feed amino acids by *C. glutamicum* is influenced by such factors as dry matter content and active acidity of the medium. It was found that the best producers of feed acids are *C. glutamicum* B-1002 and *C. glutamicum* B-1722 strains cultivated on media composed of soy molasses and distilled water at a dilution of 1:9.

**Keywords:** soy molasses, *C. glutamicum* B-1002, *C. glutamicum* B-1722, *C. glutamicum* B-2306, feed amino acids, chromatogram, cultivation, metabolites

#### The authors

Dr Maria I. Zimina, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.  
E-mail: mariia.zimina@list.ru

Dr Svetlana Y. Noskova, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.  
E-mail: s\_noskova2022@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1198-1951>

Prof Elena V. Ulrich, Kaliningrad State Technical University, Russia.  
E-mail: elen.ulrich@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-4107-7277>

Kristina S. Afanasyeva, Junior Researcher, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.  
E-mail: udgen73@mail.ru

Natalia S. Fedotovskikh, Closed Joint Stock Company Sodruzhestvo-Soya, Russia.

Prof Olga V. Krieger, Immanuel Kant Baltic Federal University, Russia.  
E-mail: olgakrigger58@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0002-1489-0716>