

РАЗРАБОТКА СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВО-ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ РАПСОВОГО ШРОТА

А.И. Нечаева^{1,2}, albinanemo@gmail.com

Е.Г. Ковалева¹, e.g.kovaleva@urfu.ru

Д.Ю. Савиных³, geolog13@yandex.ru

¹ Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

² ООО «Уральская биоинжиниринговая компания», Екатеринбург, Россия

³ ООО НПЦ «Уралбиосинтез», Екатеринбург, Россия

Аннотация. В настоящее время для промышленного культивирования становится нерентабельным использование дорогостоящих синтетических питательных сред, поэтому необходимо искать новые компоненты, отвечающие требованиям рынка. Используемые гидролизаты растительного сырья, например, соевой муки, за последние 5 лет выросли в цене почти в 10 раз. Поиск новых источников сырья и технологических решений для производства компонентов питательных сред является главным направлением разработок биотехнологов. Одним из перспективных источников для получения компонентов питательных сред для биотехнологической промышленности РФ может стать рапс. На территории РФ посевы рапса с 2017 по 2022 год выросли более чем в два раза: с 1 млн га до 2,3 млн га, и планируемое увеличение объемов посевных площадей к 2027 г. составит 9 млн га. Переработка рапсового шрота и жмыха является приоритетной задачей, стоящей перед научным сообществом. Используя биотехнологические решения, производственные циклы не образуют отходы, а целевые продукты не имеют в своем составе антипитательные вещества (эруковая кислота, глюкозинолаты с продуктами распада). Целью данного исследования является разработка состава питательной среды на основе гидролизата рапсового шрота для получения белково-ферментного комплекса в качестве кормовой добавки. В данной статье рассматривается оптимизация процесса ферментации рапсового шрота и конструирование ПС (питательных сред) для культивирования промышленных продуцентов *Bacillus subtilis*. Полученные после биотрансформации образцы целевых продуктов показали высокие ростовые характеристики при использовании лабораторных моделей ПС.

Ключевые слова: биотехнологическая переработка, ферментативный гидролиз, микроорганизмы, питательные среды

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (МЕГАГРАНТ, договор № 075–15-2022-1118 от 29.06.2022).

Для цитирования: Нечаева А.И., Ковалева Е.Г., Савиных Д.Ю. Разработка состава питательной среды для получения белково-ферментного комплекса из рапсового шрота // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». 2024. Т. 12, № 2. С. 12–19. DOI: 10.14529/food240202

Original article
DOI: 10.14529/food240202

DEVELOPMENT OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION FOR OBTAINING A PROTEIN-ENZYME COMPLEX FROM RAPESEED MEAL

A.I. Nechaeva^{1,2}, albinanemo@gmail.com

E.G. Kovaleva¹, e.g.kovaleva@urfu.ru

D.Yu. Savinykh³, geolog13@yandex.ru

¹ Ural Federal University First President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia

² Ural Bioengineering Company LLC, Yekaterinburg, Russia

³ UralBioSintez LLC, Yekaterinburg, Russia

Abstract. Currently, the industrial cultivation is becoming unprofitable due to the use of expensive synthetic nutrients, so it is necessary to look for new components that meet market demands. The prices of hydrolysates of plant raw materials, such as soy flour, have increased almost tenfold in the last 5 years. The search for new sources of raw materials and technological solutions for the production of nutrient components is the main direction of development for biotechnologists. In the territory of the Russian Federation, rapeseed plantings from 2017 to 2022 grew more than twice: from 1 million hectares to 2.3 million hectares and there is an increase in the volume of crops sown for the year 2024. The processing of rapeseed cake and meal is a priority task facing the scientific community. By utilizing biotechnological solutions, production cycles do not generate waste, and the target products do not contain anti-nutritional substances (erucic acid, glucosinolates with degradation products). The purpose of this study is to develop a nutrient medium based on rapeseed cake hydrolysate for obtaining a protein-enzyme complex as a feed additive. This article discusses the optimization of the rapeseed cake fermentation process and the design of media for cultivating industrial producers of *Bacillus subtilis*. The samples of target products obtained after biotransformation showed high growth characteristics when using laboratory-scale media models.

Keywords: biotechnological processing, enzymatic hydrolysis, microorganisms, nutrient media

Acknowledgments. The work was carried out with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (MEGAGRANT, contract No. 075–15-2022-1118 dated June 29, 2022).

For citation: Nechaeva A.I., Kovaleva E.G., Savinykh D.Yu. Development of nutrient medium composition for obtaining a protein-enzyme complex from rapeseed meal. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2024, vol. 12, no. 2, pp. 12–19. (In Russ.) DOI: 10.14529/food240202

Введение

В производстве используют питательные искусственные среды с добавлением дорогостоящих витаминов и других добавок. Для промышленного культивирования бактерий использовать такие дорогостоящие питательные среды нерентабельно. Поэтому необходимо находить новые методы, которые предлагают такой же потенциал роста, что и синтетические питательные среды, полученные с меньшими затратами [1].

Ранее потребности бактерий в аминном азоте удовлетворялись за счет добавления в питательную среду натуральных веществ, таких как кровь и жидкости организма. В настоящее время в лабораторной практике используют в основном микробиологические пептоны, созданные на основе костей. Однако не всем бактериям подходит животные гидролизаты, например, у *Bacillus subtilis* высокий выход биомассы клеток наблюдается на средах с использованием растительного сырья.

Многие исследователи сейчас интересуются растительными белками, поскольку они являются легкодоступным и дешевым сырьем. Кроме того, использование гидролизатов растений в качестве основы питательных сред исключает перенос возбудителей заболеваний, которые могут присутствовать в животном сырье.

Использование в ПС продуктов, полученных из растительных белков, является легкодоступным и дешевым сырьем. Кроме того, использование гидролизатов растений в качестве основы питательных сред исключает перенос возбудителей заболеваний и ингибиторов роста, которые могут присутствовать в животном сырье

Оптимальным источником аминокислот с высоким показателем наращивания микробной биомассы из растительного сырья является гидролизат соевой муки [2]. В РФ сейчас нет производителей гидролизата соевой муки, а посевы сои чаще замещаются другой продукцией из-за климатических условий. Нестабильность рынка соевого гидролизата может вызвать проблемы с биотехнологическими производственными циклами.

Одним из решений может быть разработка новых ПС, снижающих зависимость от дорогостоящего пептона. Исследования показывают, что промышленное культивирование микроорганизмов на альтернативных питательных средах может привести к снижению затрат и повысить эффективность рабочего процесса [3].

В цикле переработки рапса остается шрот, богатый белком, и его показатели практически сравнимы с соевой мукой [4, 5].

Возможность использования низкокачественных продуктов российского производства и последующая их глубокая переработка с применением биотехнологических решений позволит снизить зависимость внутреннего рынка от импортных продуктов. Это не только сократит расходы на питательные среды, но и поможет уменьшить экологическую нагрузку при использовании природных ресурсов [6].

Исследования показали, что увеличение количества фермента, ответственного за гидролиз, приводит к значительному увеличению содержания аминокислот как в сырье, так и в готовом продукте [7].

Целью исследования является разработка состава питательной среды на основе гидролизата рапсового шрота для получения белково-ферментного комплекса в качестве

кормовой добавки и оптимизация ПС на основе ферментативного гидролизата рапсового шрота для достижения высокого роста биомассы бактерий для использования в промышленном культивировании.

Проведение дальнейших исследований в области конструирования и оптимизации ПС на российских источниках сырья позволят укрепить продовольственную безопасность и снизить зависимость от импорта.

Объекты и методы исследований

Объект исследований: ферментативный гидролизат рапсового шрота. Ферментативный гидролиз проводился в шейкере-инкубаторе с инактивацией фермента на водяной бане [8], фильтрацией, нейтрализацией жидких фильтратов и стерилизацией конечного продукта.

Содержание аминокислот определяли методом формольного титрования [9]. Аминокислотный состав определяли методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-105М» [10, 11]. Питательная среда для культивирования была взята согласно прописи [12].

Для жидких питательных сред количество аминокислот гидролизатов составило 0,4 г/л [13]. Компоненты питательной среды: магний сернокислый 7-водный, марганец сернокислый 5-водный, железо сернокислое 7-водное, кальций сернокислый 6-водный, натрий хлористый, глюкоза, рапсовый гидролизат 0,4 г/л. Для посева использовался промышленный штамм *Bacillus subtilis* компании ООО «Био-ПромСинтез». Для сравнения использовался ферментативный пептон (ООО Южный порт, г. Оболенск), получаемый из животного сельскохозяйственного сырья [14].

Покраску закрепленных мазков проводили методом Циль-Нильсена [15]. Содержание клеток смотрели нефелометрическим методом, определением по мутности.

Результаты и их обсуждение

Для оптимизации ферментативного гидролизата варьировались такие параметры, как содержание аминокислот, количество фермента и время ферментации.

Увеличение дозы фермента, ответственного за гидролиз, приводит к изменению содержания аминокислот (табл. 1) в конечном продукте, что является важным показателем для формирования промышленного регламента.

Из анализа данных таблицы можно сделать вывод, что целесообразно проводить

ферментацию более 48 часов, потому что при более длительной ферментации снижается содержание аминного азота. Это может быть связано с разложением аминокислот под воздействием ферментов и образованием других соединений.

Таблица 1
Содержание аминного азота с разной концентрацией фермента и временем ферментации

Наименование показателя	Число показателя	Содержание аминного азота, %
Масса вносимого фермента, г	1	0,93 ± 0,20
	3	1,61 ± 0,54
	5	1,87 ± 0,20
	7	2,57 ± 0,35
	10	3,96 ± 0,20
Время ферментации, ч	2	0,58 ± 0,20
	4	0,39 ± 0,20
	6	0,42 ± 0,20
	8	0,54 ± 0,20
	24	1,59 ± 0,06
	34	1,87 ± 0,00
	48	1,47 ± 0,20

В ходе исследования было установлено, что между содержанием аминного азота и количеством фермента существует корреляция, которую нужно учитывать при расчете экономической модели производства конечного продукта. Из рис. 1 видно, что при внесении

10 г фермента в исходную смесь рапсового шрота с водой (гидромодуль 1:8) в гидролизате обнаружено максимальное содержание аминокислот.

Максимальные содержания индивидуальных аминокислот, таких как фенилаланин и серин, метионин и валин, пролин были обнаружены при внесении 5, 7 и 3 г фермента соответственно. Они были выше таковых в случае получения других гидролизатов, что может говорить о более высокой активности и эффективности фермента в процессе гидролиза.

На рис. 2 представлены данные аминокислотного состава гидролизатов с различным временем ферментации. Из данных следует, что суммарное количество аминокислот содержится в гидролизате спустя 48 часов протекания ферментативного процесса.

Оптимальное время ферментации может варьироваться в зависимости от типа гидролизата и желаемого содержания аминного азота.

Глубинное культивирование с использованием рапсового гидролизата

Культивирование *Bacillus subtilis* проводилось в ПС, содержащей рапсовый гидролизат, с целью измерения ростовых характеристик продуцентов в составе ПС и качества конечного продукта [16].

К 500 мл среды добавлялись 2 мл посевного материала с КОЕ 2×10^9 . Культивирование проводилось при температуре 37 °С, скорости перемешивания 140 оборотов в минуту и времени 48 часов. Отбор проб проводился через 24 часа и 48 часов.

Было найдено, что в случае 24-часового

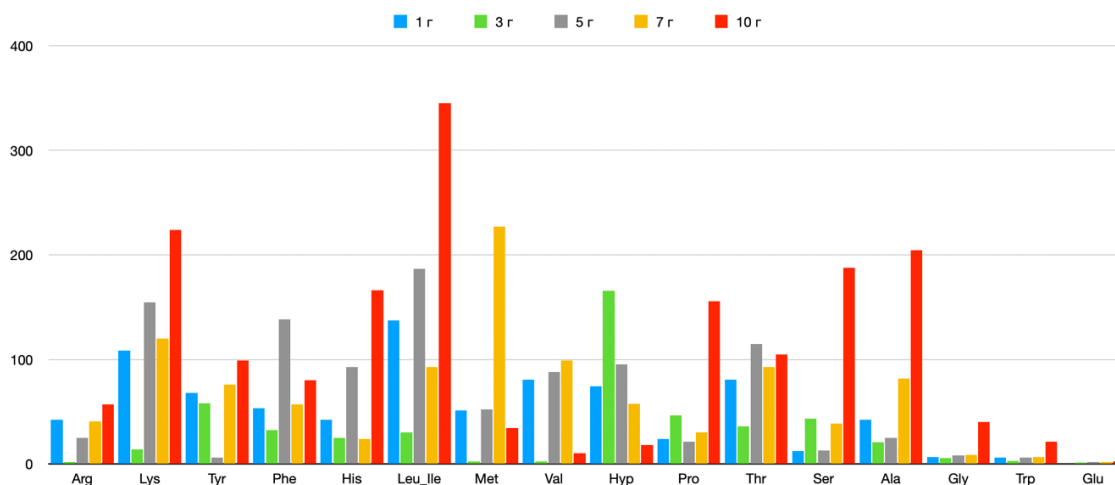


Рис. 1. Аминокислотный состав гидролизатов с различным количеством фермента

культивирования *Bacillus subtilis* на ПС, содержащей рапсовый гидролизат, идет более активный рост бактерий по сравнению с пептон-содержащей ПС (рис. 3).

На рис. 4 показано, что после 48 часового культивирования *Bacillus subtilis* на ПС с рапсовым гидролизатом идет активно процесс спорообразования и наблюдается максимальное количество зрелых спор.

Из табл. 2 видно, что в ПС с внесенным рапсовым гидролизатом (при 7 г вносимого фермента) в течение 48 часов культивирования было найдено большее содержание зрелых спор и вегетативных бактериальных клеток по сравнению с таковым для пептона (Оболенск).

В результате ферментативные гидролиза-

ты являются предпочтительными источниками азота для создания питательных сред. Они обладают высоким содержанием полезных аминокислот, отличаются безопасностью и стабильностью. Это позволяет достичь оптимальных условий для роста и развития клеток *Bacillus subtilis*.

Таблица 2
Содержание клеток после культивирования в разных источниках аминного азота, клеток/мл

Образец	Культивирование	
	24 часа	48 часов
Рапсовый гидролизат	$7,2 \times 10^9$	$10,9 \times 10^9$
Пептон Оболенск	$5,9 \times 10^9$	$6,3 \times 10^9$

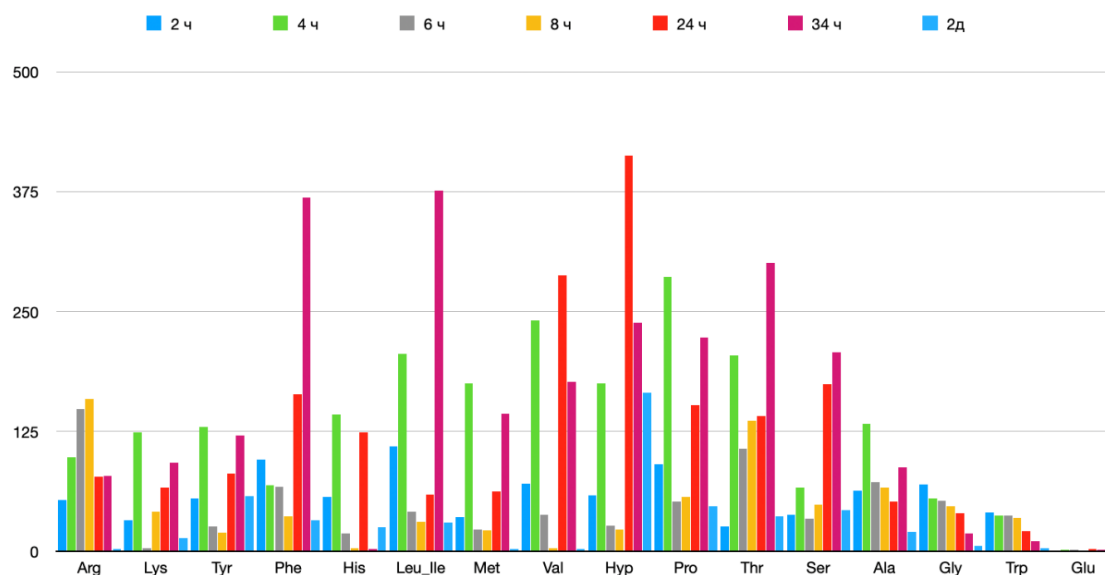


Рис. 2. Аминокислотный состав гидролизатов с разным временем ферментации

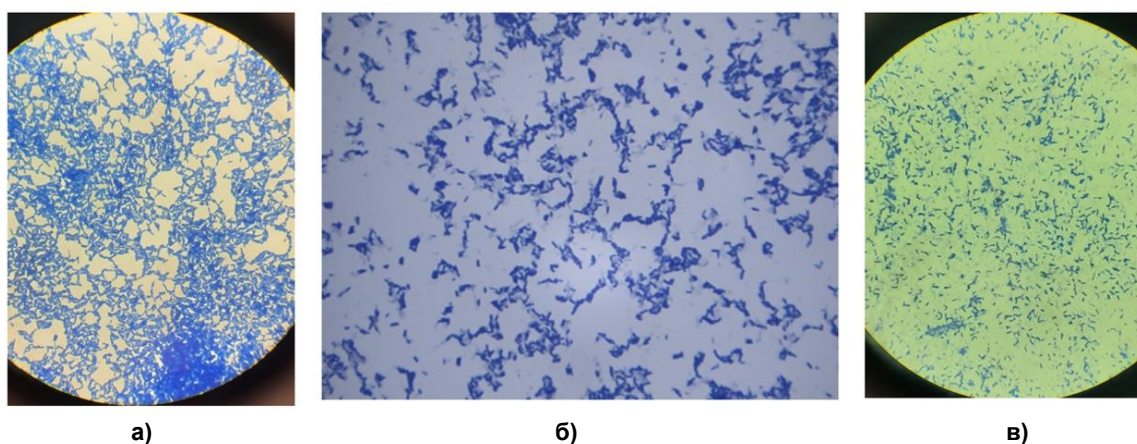


Рис. 3. Культивирование *Bacillus subtilis* в течение 24 часов: а) ПС с рапсовым гидролизатом (при 7 г вносимого фермента); б) ПС с пептоном (Оболенск) в) ПС с рапсовым гидролизатом (ферментация 48 ч)

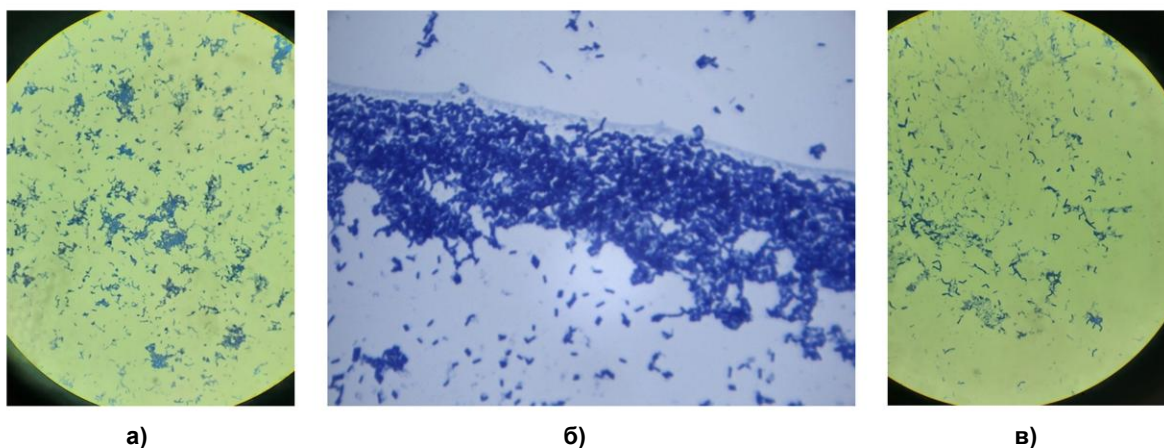


Рис. 4. Культивирование *Bacillus subtilis* в течение 48 часов: а) ПС с рапсовым гидролизатом (при 7 г вносимого фермента); б) ПС с пептоном (Оболенск) в) ПС с рапсовым гидролизатом (ферментация 48 ч)

Выводы

Скорость накопления биомассы *Bacillus subtilis* и ее биологические характеристики в процессе культивирования показывают, что ПС на ферментативном гидролизате рапсового

шрота и соевой муки имеют близкие показатели, что может являться основанием для рекомендации использования рапсового шрота в производстве перспективных целевых продуктов для ПС.

Список литературы

1. Старцева О.Л. Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения: дис... канд. биол. наук. Ставрополь, 2005. 182 с.
2. Вишняков А.В. Приготовление питательных сред на основе гидролизата соевой муки для глубинного культивирования бактерий рода *Bacillus*: дис... канд. биол. наук. М., 2006. 120 с.
3. Горковенко Л.Г., Осепчук Д.В. Использование рапса и продуктов его переработки в кормлении свиней и мясной птицы: монография. Краснодар, 2011. 192 с.
4. Егорова Т.А., Ленкова Т.Н. Рапс (*Brassica napus* L.) и перспективы его использования в кормлении птицы // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50, № 2. С. 172–182. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.2.172rus
5. Гращенкова К. В. Новая питательная среда на основе побочных продуктов птицеводства для получения белково-пробиотического кормового концентрата [Текст]: маг. дис. / Гращенкова К. В. Екатеринбург, 2022. 81 с.
6. Pasupuleti V.K. Manufacturing of protein hydrolysates and bioactive peptides // Presented at the annual meeting of Institute of Food Technologists. New Orleans, LA. 2005.
7. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение // Аграрная наука. М., 2000.
8. Ферментативный гидролиз соевого белка / Д.В. Соколов, Б.А. Болхонов, С.Д. Жамсаранова и др. // Техника и технология пищевых производств. 2023. № 1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/fermentativnyy-gidroliz-soevogo-belka> (дата обращения: 06.01.2024).
9. ОФС.1.2.3.0022.15 Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования.
10. Каменцев Я.С., Комарова Н.В. Основы метода капиллярного электрофореза. Аппаратурное оформление в области применения // Аналитика и контроль. 2002. Т. 6, № 1. С. 13–18.
11. Шелехова Н.В., Поляков В.А., Римарева Л.В. Капиллярный электрофорез – высокоэффективный аналитический метод исследования состава сложных биологических сред // Пиво и напитки. 2017. № 2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kapillyarnyy-elektroforez-vysokoeffektivnyy-analiticheskiy-metod-issledovaniya-sostava-slozhnyh-biologicheskikh-sred> (дата обращения: 06.01.2024).

12. Щербачков М.Г., Ильязов А.А., Шапошникова М.Ю. Влияние состава питательных сред на протеолитическую активность глубинных культур *Bacillus subtilis* ВКПМ 2335 и *Bacillus licheniformis* ВКПМ 2336 / Научно-исследовательский центр Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Екатеринбург. 2014.
13. Шепелин А.П. Разработка технологии производства панкреатического гидролизата рыбной муки и конструирование на его основе бактериологических питательных сред: дис... канд. биол. наук: 03.01.06. М., 2013. 135 с.
14. Метод окраска по Циллю-Нильсену. URL: <https://microsignt.ssmu.ru/index.php/metody-okraski-mm/slozhnye-metody-m/po-tsilyu-nilsenu>
15. Лавренчук Л.С., Ермошин А.А. Микробиология: практикум. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019. 107 с.

References

1. Startseva O.L. *Sovershenstvovaniye biotekhnologii proizvodstva pitatel'nykh sred dlya kul'tivirovaniya chumnogo mikroba na osnove syr'ya zhivotnogo i rastitel'nogo proiskhozhdeniya* [Improving the biotechnology of production of nutrient media for cultivating the plague microbe based on raw materials of animal and plant origin]. dis... cand. biol. sciences. Stavropol, 2005. 182 p.
2. Vishnyakov A.V. *Prigotovleniye pitatel'nykh sred na osnove gidrolizata soyevoy muki dlya glubinnogo kul'tivirovaniya bakteriy roda Bacillus* [Preparation of nutrient media based on soy flour hydrolyzate for deep cultivation of bacteria of the genus Bacillus]. dis... cand. biol. sciences. Moscow, 2006. 120 p.
3. Gorkovenko L.G., Osepchuk D.V. *Ispol'zovaniye rapsa i produktov yego pererabotki v kormlenii sviney i myasnoy ptitsy* [The use of rapeseed and its processed products in feeding pigs and poultry]. Krasnodar, 2011. 192 p.
4. Egorova T.A., Lenkova T.N. Rapeseed (*Brassica napus* L.) and prospects for its use in poultry feeding. *Agricultural Biology*, 2015, vol. 50, no. 2, pp. 172–182. (In Russ.) DOI: 10.15389/agrobiology.2015.2.172rus
5. Grashchenkova K.V. *Novaya pitatel'naya sreda na osnove pobochnykh produktov pitsevodstva dlya polucheniya belkovo-probioticheskogo kormovogo kontsentrata* [New nutrient medium based on poultry by-products for the production of protein-probiotic feed concentrate]: mag. dis. Ekaterinburg, 2022. 81 p.
6. Pasupuleti V.K. *Manufacturing of protein hydrolysates and bioactive peptides*. Presented at the annual meeting of the Institute of Food Technologists. New Orleans, LA, 2005.
7. Telishevskaya L.Ya. *Belkovyye gidrolizaty. Polucheniye, sostav, primeneniye* [Protein hydrolysates. Preparation, composition, application]. Journal “Agricultural Science”. Moscow, 2000.
8. Sokolov D.V., Bolkhonov B.A., Zhamsaranova S.D., Lebedeva S.N., Bazhenova B.A. Enzymatic hydrolysis of soy protein. *Equipment and technology of food production*, 2023, no. 1. (In Russ.)
9. *GPM.1.2.3.0022.15 Opredeleniye aminnogo azota metodami formol'nogo i yodometricheskogo titrovaniya* [Determination of amine nitrogen by formol and iodometric titration methods].
10. Kamentsev Ya.S., Komarova N.V. Fundamentals of the capillary electrophoresis method. Hardware design in the field of application. *Analytics and control*, 2002, vol. 6, no. 1, pp. 13–18. (In Russ.)
11. Shelekhova N.V., Polyakov V.A., Rimareva L.V. Capillary electrophoresis is a highly effective analytical method for studying the composition of complex biological media. *Beer and drinks*, 2017, no. 2. (In Russ.) URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kapillyarnyy-elektroforez-vysokoeffektivnyy-analiticheskiy-metod-issledovaniya-sostava-slozhnyh-biologicheskikh-sred> (accessed 6 January 2024).
12. Shcherbakov M.G., Ilyazov A.A., Shaposhnikova M.Yu. *Vliyaniye sostava pitatel'nykh sred na proteoliticheskuyu aktivnost' glubinnykh kul'tur Bacillus subtilis VKPM 2335 i Bacillus licheniformis VKPM 2336* [The influence of the composition of nutrient media on the proteolytic activity of deep cultures of *Bacillus subtilis* VKPM 2335 and *Bacillus licheniformis* VKPM 2336]. Research Center of the Federal State Budgetary Institution “48 Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Ekaterinburg, 2014.

13. Shepelin A.P. *Razrabotka tekhnologii proizvodstva pankreaticheskogo gidrolizata rybnoy muki i konstruirovaniye na yego osnove bakteriologicheskikh pitatel'nykh sred* [Development of technology for the production of pancreatic hydrolyzate of fishmeal and design of bacteriological nutrient media based on it]. dis... cand. biol. Sciences: Moscow, 2013. 135 p.

14. *Metod okraska po Tsilyu-Nil'senu* [Ziehl-Neelsen staining method]. URL: <https://micro-sight.ssmu.ru/index.php/metody-okraski-mm/slozhnye-metody-m/po-tsilyu-nilsenu> (accessed 5 February 2023)

15. Lavrenchuk L.S., Ermoshin A.A. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Ekaterinburg, 2019. 107 p.

Информация об авторах

Нечаева Альбина Игоревна, лаборант-исследователь, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина; ООО «Уральская биоинжиниринговая компания», Екатеринбург, Россия, albinanemo@gmail.com

Ковалева Елена Германовна, профессор, Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия, e.g.kovaleva@urfu.ru

Савиных Дмитрий Юрьевич, директор, ООО НПЦ «Уралбиосинтез», Екатеринбург, Россия, geolog13@yandex.ru

Information about the authors

Albina I. Nechaeva, research assistant, Ural Federal University First President of Russia B.N. Yeltsin; Ural Bioengineering Company LLC, Yekaterinburg, Russia, albinanemo@gmail.com

Elena G. Kovaleva, professor, Ural Federal University first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia, e.g.kovaleva@urfu.ru

Dmitry Yu. Savinykh, director, UralBioSintez LLC, Yekaterinburg, Russia, geolog13@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 20.02.2024

The article was submitted 20.02.2024