

БИОСИНТЕЗ ЛИМОННОЙ И ГЛЮКОНОВОЙ КИСЛОТ МИКРОМИЦЕТОМ *ASPERGILLUS NIGER*

Прахова М.С., Выборнова Т.В., Шарова Н.Ю. д-р техн. наук

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых ароматизаторов, кислот и красителей Российской академии сельскохозяйственных наук, Санкт-Петербург

В данной работе представлены результаты исследований биосинтеза лимонной и глюконовой кислот при ферментации различных источников углеводов. Показана динамика изменения активности глюкозооксидазы, катализирующей реакцию окисления глюкозы в глюконовую кислоту.

В настоящее время на отечественном рынке пищевая лимонная кислота широко представлена зарубежными фирмами. В России выпуском данной продукции занимается один завод (ООО «Цитробел», г. Белгород). Производство глюконовой кислоты осуществляется только за рубежом.

Глюконовая кислота и ее δ -лактон представляют собой продукт дегидрогенизации β -D-глюкозы. Для их синтеза применяются различные методы, а именно химический, электрохимический, биохимический и ферментативный. В настоящее время ферментация является приоритетным направлением в промышленном производстве глюконовой кислоты.

Глюконовая кислота и ее соли востребованы и используются в фармацевтической, пищевой, кормовой, текстильной, кожевенной промышленности.

Актуальным является разработка технологии глюконовой кислоты и внедрение её на российские предприятия. Одним из путей реализации может стать создание «совмещенной» технологии биосинтеза лимонной и глюконовой кислот. С помощью подбора условий культивирования гриба-кислотообразователя *Aspergillus niger* можно изменить направленность биотехнологического процесса в сторону увеличения выхода глюконовой кислоты.

Объектом исследования являлся штамм-кислотообразователь микромицет *A. niger* Л-4 из коллекции института.

В качестве сырья для получения лимонной и глюконовой кислот были испытаны мелассы различного качества, гидролизаты помолов нативного зерна ржи и пшеницы (размер частиц ≤ 1 мм), и глюкоза (ГОСТ 6038-79).

Микромицет *A. niger* синтезирует ферменты, относящиеся ко всем известным классам энзимов. Высокая пластичность ферментной системы предоставляет возможность смещения биотехнологического процесса в

сторону образования глюконовой кислоты при изменении условий культивирования.

Ранее в институте были проведены исследования по применению различного зернового сырья для глубоинной ферментации штаммом *A. niger* Л-4 [1]. В сравнительном аспекте при ферментации гидролизатов помола нативного зерна ржи и пшеницы были выявлены различия в таком показателе как «общая кислотность». Масса органических кислот при культивировании микромицета на гидролизате помола нативного зерна ржи была выше и составила 4,1-4,5 г/колбы против (3,5±0,1) г/колбы на гидролизате помола нативного зерна пшеницы. Использование гидролизата помола нативного зерна ржи в качестве источника углеводов позволило повысить продуктивность биосинтеза глюконовой кислоты. К тому же на этом сырье уменьшается выход щавелевой кислоты как побочного продукта биосинтеза.

Таблица 1

Контролируемые показатели процесса ферментации различных источников углеводов штаммом *A. niger* Л-4

Наименование сырья	Целевой метаболит	Наименование показателя				
		Сухая биомасса с остаточной влажностью 10 %, г/дм ³	Масса органических кислот, г/колба	Содержание кислоты в сумме органических кислот, %		
				лимонная	глюконовая	щавелевая
Гидролизат помола нативного зерна пшеницы	Лимонная кислота	18,0-20,0	34-3,6	81,3-83,7	8,1-8,5	9,1-9,3
Гидролизат помола нативного зерна ржи	Лимонная и глюконовая кислоты	18,3-22,8	4,1-4,5	77,5-80,3	14,0-16,2	3,5-8,5
Меласса стандартного качества	Лимонная кислота	14,5-16,6	4,3-4,5	80,5-88,0	8,3-12,5	3,7-7,0
Меласса низкого качества	Лимонная и глюконовая кислоты	17,2-18,3	4,3-4,5	50,3-55,2	28,6-35,0	9,8-21,1
Глюкоза	Лимонная и глюконовая кислоты	11,0-13,0	0,95-2,10	48,8-49,6	45,1-45,3	5,1-5,8

На существующих производствах для биосинтеза лимонной кислоты, как правило, в качестве сырья применяется меласса. Поэтому были исследованы два образца мелассы разного качества. По результатам проведенных экспериментов наилучшее соотношение по выходу лимонной и глюконовой кислот было достигнуто на мелассе низкого качества (50,3-55,2% лимонной кислоты и 28,6-35,0% глюконовой кислоты). Но нельзя не отметить, что при этом возрастает доля щавелевой кислоты в пределах от 9,8 % до 21,1% от суммы всех органических кислот. Также меласса низкого качества не соответствует по ряду химических и микробиологических показателей требованиям нормативной документации, и поэтому не возможно ее применение в заводских условиях.

Согласно данным таблицы 1 наилучшие результаты по смещению процесса ферментации в сторону образования глюконовой кислоты получены при использовании глюкозы. Однако наблюдалось резкое снижение массы органических кислот (до 0,95-2,05 г/колбы), что является существенным недостатком. Поэтому увеличение «общей кислотности» является приоритетом в дальнейшем изучении глюкозы в качестве сырья для получения двух кислот в одном технологическом процессе.

Также одним из важных критериев оценки эффективности процесса ферментации является выход биомассы. Наилучшие результаты по этому показателю были достигнуты при ферментации на мелассе стандартного качества. На мелассе низкого качества этот показатель в 1,2 раза выше. Наибольший выход биомассы достигнут при ферментации гидролизатов помолов зерновых культур и составил 18,3-22,80 г/дм³ и 18,0-20,0 г/дм³ в экспериментах с помолом зерна ржи и пшеницы соответственно. При культивировании микромицета *A. niger* на глюкозе отмечена положительная тенденция к уменьшению выхода биомассы (11,0-13,0 г/дм³).

Важным аспектом в процессе ферментации *A. niger* является количество макро- и микроэлементов в питательной среде.

Результаты экспериментов показали, что введение дополнительного минерального источника азота в питательную среду способствует увеличению общей кислотности. Так, применительно к гидролизату помола нативного зерна ржи отмечено увеличение продуктивности биосинтеза глюконовой кислоты штаммом Л-4 на 7-9 % при массовой концентрации нитрата аммония в среде не более 1,0 г/дм³. Выявлена необходимость в ионах К и Mg, которые вносили в среду в составе солей MgSO₄ и KН₂PO₄. Как установлено, Mn, Cu, Zn, Fe на направленность процесса не влияли.

Изучение влияния технологических факторов на биосинтез лимонной и глюконовой кислот при периодическом способе ферментации гидролизатов зерновых помолов позволило установить значения показателей биотехнологического процесса. Наиболее предпочтительным для

обеспечения направленности биосинтеза является рН исходной питательной среды 5,5-6,5. Подобранные условия адекватны условиям, благоприятным для биосинтеза только лимонной кислоты. Установлена температура ферментации для изменения направленности процесса в сторону биосинтеза глюконовой кислоты, (34±1) °С против (32±1) °С. Лимитирование процесса по кислороду в этих условиях приводит к интенсификации кислотообразования и увеличению выхода глюконовой кислоты. Так, при скорости перемешивания культуральной жидкости (160±1) об/мин в условиях шейкера-инкубатора Multitron в качалочных колбах интенсивность биосинтеза глюконовой кислоты выше на 6-8 %, чем при скорости 200 об/мин. Однако изменение параметра до 140 об./мин снижало равномерность суспендирования конидий продуцента в жидкой ферментационной среде, что замедляло накопление биомассы, отрицательно сказывалось на метаболизме и кислотообразовании. Для увеличения продуктивности биосинтеза глюконовой кислоты при ферментации глюкозы эффективен следующий режим: 300 об/мин, 30°С.

Одним из критериев оценки степени биоконверсии глюкозы в глюконовую кислоту может являться активность глюкозооксидазы. Этот фермент обладает высокой субстратной специфичностью и окисляет β-D-глюкозу до 1,5-глюконолактона. Последующий гидролиз лактона до глюконовой кислоты в некоторой степени спонтанен, но важную роль в этой реакции играет фермент глюколактоназа.

Было проведено множество исследований, направленных на изучение свойств глюкозооксидазы в клетках мицелия различных микроорганизмов и культуральной жидкости. Так, например, Natzinikolaou и Macris исследовали влияние различных источников углерода на уровень и общую активность глюкозооксидазы у *A. niger*. Хотя микроцист развивался на всех тестируемых источниках углерода, высокий уровень активности глюкозооксидазы был зафиксирован только на средах, содержащих глюкозу, сахарозу или патоку [2].

Активность глюкозооксидазы в проведенных нами исследованиях измерялась при помощи экспресс-метода [3]. Этот метод основан на титрометрическом определении количества перекиси водорода, образующейся в процессе окисления глюкозы глюкозооксидазой (рис.1).

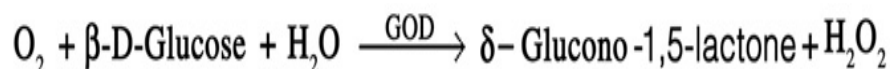


Рис. 1. Ферментативный синтез глюконовой кислоты

Была изучена посуточная динамика активности глюкозооксидазы в культуральной жидкости, полученной в результате культивирования *A. niger*. Как показано на рисунке 2, наибольшая активность фермента была

зафиксирована после 24 ч ферментации. Это связано с активизацией ферментной системы микромицета. В среде присутствовало избыточное количество глюкозы, которое потреблялось грибом *A. niger* в первую очередь. При дальнейшем культивировании активность глюкозооксидазы начинает постепенно снижаться и к четвертым суткам отсутствует. По-видимому, это связано с полной биоконверсией глюкозы.

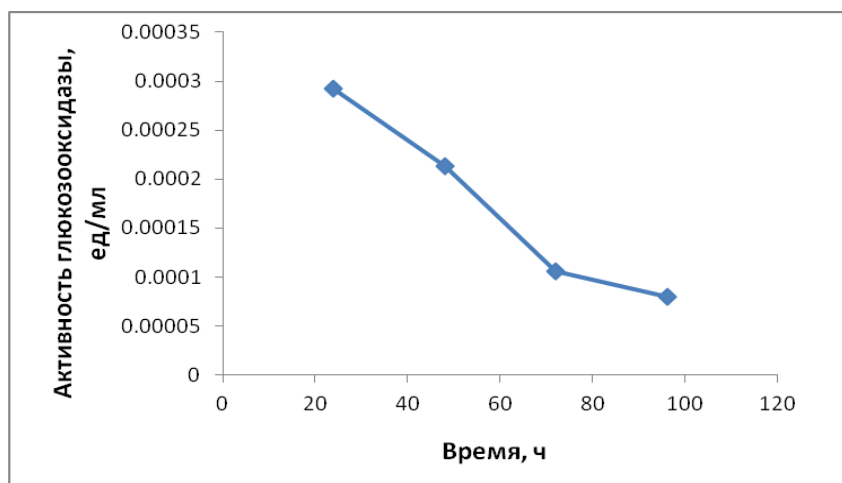


Рис. 2. Изменение активности глюкозооксидазы в зависимости от времени ферментации *A. niger*

Таким образом, установленные закономерности биосинтеза лимонной и глюконовой кислот при ферментации на различных типах сырья и различных параметрах технологических факторов свидетельствуют о возможности изменения направленности процесса с продуктивным образованием двух метаболитов (лимонной и глюконовой кислот). Полученные экспериментальные данные являются основой дальнейших исследований по оптимизации состава питательной среды и режимов ферментации с целью увеличения продуктивности биосинтеза лимонной и глюконовой кислот и создания новой совмещенной технологии.

Литература

1. Шарова Н.Ю., Выборнова Т.В., Волкова А.А. Способы деструкции зернового сырья для биосинтеза лимонной и глюконовой кислот/Сб. материалов XII Междунар. научно-практ. конф. «Инновационные технологии в пищевой промышленности», Минск, С.95-96.
2. Hatzinikolaou DG, Macris BJ. Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*.// *Enzyme Microb Technol* -1995,17:530–4.
3. <http://moondrive.ru/metody-eksperimentalnoy-mikologii/126-ekspress-metod-opredeleniya-aktivnosti-glyukozooksidazy-chast-1.html>.