



Biolog. Journal of Armenia, 1 (71), 2019

## ПОЛУЧЕНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ ИЗ КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА В ПРОЦЕССЕ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ПЛЕСНЕВОГО ГРИБА ВИДА *ASPERGILLUS NIGER*

И.Э.МЕЛКУМЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА  
melk.77@mail

Настоящее исследование посвящено разработке технологии выделения лимонной кислоты из инулинсодержащего экстракта клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus*) с применением плесневых грибов *Aspergillus niger*. Показано, что микробиологическое получение лимонной кислоты из топинамбура экономически выгодно, поскольку его клубни содержат около 20% инулина.

*Топинамбур – инулин – плесневый гриб – лимонная кислота*

Տվյալ ուսումնասիրությունը նվիրված է գետնախնձորի (*Helianthus tuberosus*) պալարների ինուլին պարունակող լուծամզվածքից կիտրոնաթթվի անջատման տեխնոլոգիայի մշակմանը: Այս նպատակով օգտագործվում է *Aspergillus niger* տեսակին պատկանող բորբոսասունկը: Գետնախնձորից կիտրոնաթթվի մակրոէաբանական ստացումը տնտեսապես ձեռնտու է, քանի որ նրա պալարներում պարունակվում է մոտ 20 % ինուլին:

*Գետնախնձոր – ինուլին – բորբոսասունկ – կիտրոնաթթու*

This study is devoted to the development of technology for the isolation of citric acid using mold fungi of the species *Aspergillus niger* from inulin-containing extract of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*). It has been shown that microbiological synthesis of citric acid from Jerusalem artichoke is economically beneficial, because tubers contain about 20% inulin.

Jerusalem artichoke- inulin-mold fungus-citric acid

Органические кислоты находят широкое применение в фармацевтической, химической, пищевой, текстильной и других отраслях промышленности. Пищевая промышленность традиционно является основным потребителем лимонной, уксусной и молочной кислот [2, 4, 9]. К органическим кислотам относятся преимущественно карбоновые, молекулы которых содержат одну или несколько карбоксильных групп COOH. В зависимости от наличия карбоксильных групп различают одноосновные, двухосновные и трехосновные карбоновые кислоты.

Лимонная кислота является трехосновной оксикислотой [2, 8]. Это кристаллическое вещество белого цвета, хорошо растворимо в воде и этиловом спирте. В наибольшей концентрации она содержится в ряде растений: в плодах цитрусовых,

в ягодах, стеблях и листьях табака. Сама лимонная кислота, как и её соли – цитраты, широко используется во многих отраслях: в пищевой промышленности как вкусовая добавка, регулятор кислотности и консервант (пищевые добавки E330—E333), для производства плавящихся сыров, напитков, сухих шипучих напитков, в медицине в качестве консерванта при переливании крови, в том числе в составе средств, улучшающих энергетический обмен, активирует цикл Кребса, способствуя ускорению метаболизма. Широко используется в бытовой химии в качестве очистительного средства [4,8].

Около 60 лет назад лимонную кислоту выделяли преимущественно из плодов цитрусовых растений. Несмотря на значительный прогресс в области органического синтеза, в настоящее время многие органические кислоты – лимонная, молочная, уксусная получают микробиологическим синтезом. Основой микробиологического производства в биотехнологии является использование штаммов-продуцентов для получения того или иного продукта в процессе метаболизма. В частности, лимонную кислоту получают путем микробиологического синтеза с использованием плесневого гриба *Aspergillus niger* из сахаристых веществ [10]. *Aspergillus niger* относится к классу сумчатых грибов (*Ascomycetes*), семейству аспергилловых (*Aspergillaceae*), роду *Aspergillus*, который насчитывает свыше 120 видов [3]. Как правило, грибы растут на богатых углеродом субстратах. В настоящее время лимонная кислота производится с помощью микробиологического синтеза, в качестве основного сырья используется меласса, являющаяся отходом сахарного производства из сахарной свеклы, которая содержит 40-46% сахарозы. [8,9]. Однако она не является единственным источником сырья для получения лимонной кислоты. В течение многих десятилетий проводились исследования по микробиологическому синтезу лимонной кислоты из различных субстратов: фруктозы, глюкозы, сахарозы, крахмала, целлюлозы, углеводов. Возможность использования клубней топинамбура для получения лимонной кислоты на момент начала работы не была изучена.

Топинамбур (*Helianthus tuberosus*) – это травянистое растение, которое не требует особого ухода. Это неприхотливое, засухоустойчивое, морозостойкое и урожайное растение. Клубни топинамбура содержат около 15-20% инулина. Инулин – высокомолекулярный углевод, полисахарид (полимер) растительного происхождения, мономерами которого являются фруктоза (97%) и глюкоза (3%). Подобно крахмалу, инулин служит запасным веществом, встречается главным образом во многих растениях семейства сложноцветных: в корнях топинамбура содержание инулина доходит до 20%, в цикории и клубнях георгины до 15%, репчатом луке до 2-5% [6]. Учитывая неприхотливость топинамбура и высокое содержание инулина в его корнях, нами впервые был предложен способ получения лимонной кислоты путем культивирования штаммов плесневого гриба *Aspergillus niger* на экстракте, полученном из инулинсодержащего сырья клубней топинамбура.

**Материал и методика.** В качестве объекта исследования использовали штамм плесневого гриба *Aspergillus niger*, полученный из коллекции культур микроорганизмов Центра депонирования микробов НПЦ Армбиотехнология НАН РА.

Для получения лимонной кислоты штамм культивировали на водном экстракте измельченных клубней топинамбура.

Штамм культивировался на синтетической среде Чапека следующего состава (г/л):  $\text{NaNO}_3$  -2.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.01,  $\text{KCl}$  -0.5 [5].

Кислотность определяли индикатором метиловым красным (метилрот) [1].

Количественное содержание лимонной кислоты определяли методом титрования 0,5N раствором гидроксида натрия по следующей формуле:

$$x = \frac{N_s * V * E_x}{q * 10} * 100\% ,$$

где  $x$  – процентное содержание лимонной кислоты (%),  $N_s$  – нормальность титруемого раствора,  $V$  – объем титруемого вещества,  $E_x$  – эквивалентное количество исследуемого раствора,  $q$  – проба анализируемого вещества [1].

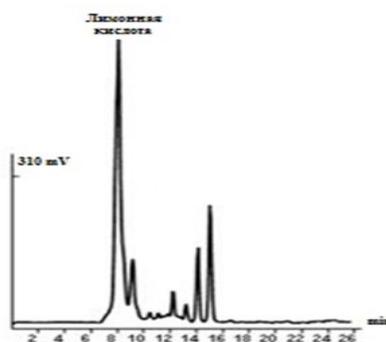
Содержание органических кислот в культуральной жидкости определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе "Water Separations Modul 2695", США.

**Результаты и обсуждение.** С целью выяснения возможности биоконверсии инулина в лимонную кислоту и получения ее из клубней топинамбура нами проводились микробиологические и биохимические исследования. Для эффективного осуществления экстракции на 1 кг измельченных клубней добавляли 2 л дистиллированной воды и при постоянном перемешивании выдерживали в течение 30 мин при температуре 70-75<sup>0</sup>С. Согласно литературным данным, выход инулина значительно увеличивается при pH 6,0-6,5 [7]. Далее проводили центрифугирование экстракта, надосадочную жидкость с инулином отделяли от фугата, обесцвечивали активированным углем. Культивирование плесневого гриба *Aspergillus niger* на экстракте осуществляли в термостате при температуре 25<sup>0</sup>С. Уже на 2-3 сут наблюдалось подкисление среды. В культуральную жидкость добавлялся краситель метиленовый красный: на 100 мл питательной среды 1 мл 0,1 %-ного спиртового раствора. При образовании кислоты в процессе роста штамма культуральная жидкость окрашивалась в красный цвет. Максимальное кислотообразование происходит на 4-5 сут. Значение pH снижается от 6.5 до 3.5-3.0.

В результате данных, полученных на ВЭЖХ, в сброженном растворе была обнаружена смесь органических кислот – лимонной и яблочной. Кроме упомянутых органических кислот, в растворе содержались также другие органические кислоты, которые не идентифицировались (табл. 1, рис. 1).

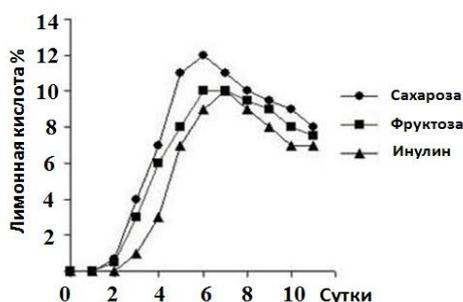
**Таблица 1.** Содержание органических кислот в культуральной жидкости *Aspergillus niger*

Название кислот	Время выхода	Площадь выхода	Количество, %
Лимонная кислота	8,049	3247150,56	5,8409
Неидентифицированная кислота	9,412	64512031	–
Неидентифицированная кислота	11,221	7413,12	–
Яблочная кислота	12,667	114321,12	1,2407
Неидентифицированная кислота	14,312	788096,21	–
Неидентифицированная кислота	15,478	1024541,69	–



**Рис 1.** Хроматограмма культуральной жидкости *Aspergillus niger*

В лабораторных условиях лимонную кислоту получали путем культивирования плесневого гриба *Aspergillus niger* на синтетической среде Чапека с добавлением различных источников углерода, таких как сахароза, фруктоза и инулин. Результаты свидетельствуют о весьма близких выходах лимонной кислоты из указанных субстратов (рис. 2), но наилучшим исходным веществом для образования лимонной кислоты является сахароза. Однако, учитывая доступность инулинсодержащего сырья из корней топинамбура, дальнейшие наши исследования по подбору источника углерода были продолжены именно с использованием этого сырья.



**Рис 2.** Синтез лимонной кислоты на различных источниках углерода с использованием штамма *Aspergillus niger*.1

При обобщении полученных результатов выявилась возможность биоконверсии инулина и простых сахаров, содержащихся в экстракте клубней топинамбура, в лимонную кислоту в процессе поверхностных и глубинных ферментаций штамма *A.niger*. Необходимо отметить, что производство лимонной кислоты из экстракта топинамбура является рентабельным, т.к. топинамбур неприхотливое, урожайное растение, способное расти в разных условиях. Средняя урожайность сахарной свеклы – 22 т/га, выход сахара составляет 10 % от массы сырья. Средняя урожайность клубней топинамбура – 40 т/га, выход сахара (по минимуму) – 12 % от массы сырья. Исходя из этого, с 1 га сахарной свеклы можно получить 2,2 т сахара (сахарозы), а с 1 га топинамбура – 4,8 т фруктозного сахара, который слаще обычного сахара в 1,7-2 раза.

Таким образом, впервые было установлено, что инулинсодержащий экстракт клубней топинамбура является перспективным источником для микробиологического производства лимонной кислоты с использованием штамма *Aspergillus niger*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Коренман Я.И., Лисицкая Р.П. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов. Учеб. пособие. Воронеж, с.32-52, 2002.
2. Муратова Е.И., Зюзина О.В., Шуняева О.Б. Биотехнология органических кислот и белковых препаратов. Издательство ТГТУ. Тамбов, с.3-7, 2007.
3. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Микробиология, с. 116-120, изд. Академия, М., 2006.
4. Нечаев А.П., Траубенберг С.Е. Кочеткова А.А., Пищевая химия. Санкт-Петербург. ГИОРД. 6-е изд., с.292-304, 2015.

5. Поликсенова В.Д., Храмов А.К., Пискун С.Г., МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ к занятиям спецпрактикума по разделу “Микология. Методы экспериментального изучения микроскопических грибов” “G 31 01 01 – Биология”. Минск, с.7-20, 2004.
6. Сумин Ю.А. Программа “Топинамбур” – стратегический ресурс России. Наша власть. 61, 3, 42-43, 2006.
7. Шаззо Р.И., Екутеч Р.И., Кондратенко В.В., Купин Г.А., Способ получения инулин-содержащего раствора из топинамбура. Патент РФ№2493171, с.4, 2012.
8. Berovich M., Legia M., Citric acid production, Biotechnology Annual Review, 13, pp. 303-343, 2007
9. Mattey M. The production of organic acids. Crit Rev Biotechnol., 12, p.87-132, 1992.
10. Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling, Biotechnology Advances, 25, pp 244-263, 2007.

Поступила 12.11.2018