Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

• Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
• Experimental and theoretical articles •

Биолог. журн. Армении, 4 (73), 2021

НАКОПЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В ЭКСТРАКТЕ КЛУБНЕЙ ТОПИНАМБУРА В ПРОЦЕССЕ МЕТАБОЛИЗМА ПЛЕСНЕВОГО ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER*

И.Э. МЕЛКУМЯН

НПЦ "Армбиотехнология" НАН РА
inna.melkumyan@inbox.ru

Целью данного исследования является идентификация органиеских кислот с применением плесневого гриба вида *Aspergillus niger* из инулинсодержащего экстракта клубней топинамбура (*Helianthus tuberosus)*, содержащего около 6 % инулина. Инулин – это полисахарид (полимер) растительного происхождения, состоящийся из двух мономеров – фруктозы (97 %) и глюкозы (3 %), который ранее не использовали для выделения органиеских кислот.

Топинамбур – инулин – плесневые грибы – органиеские кислоты

Ուսումնասիրության նպատակն է մշակել *Aspergillus niger* տեսակին պատկանող բորբոսանկի միջոցով օրգանական թթուներ ստանալու տեխնոլոգիա՝ գետնախնձորի պալարներից ստացած լուծամզվածքից, որոնք պարունակում են մոտ 6 % ինուլին: Ինուլինը բուսական պոլիսախարիդ է, որը կազմված է երկու մոնոմերներից՝ ֆրուկտոզ (97 %) և գլյուկոզ (3 %), այն մինչ այժմ գրեթե չի ուսումնասիրվել օրգանական թթուներ ստանալու համար:

Գետնախնձոր – ինուլին – բորբոսանկեր – կիտրոնաթթու

The purpose of this study is to develop a technology for the isolation of organic acid using mould fungi of the species *Aspergillus niger* from an extract of topinambur tubers (*Helianthus tuberosus*), which is containing about 6 % inulin. Inulin is a plant polysaccharide (polymer) consists of two monomers- fructose (97 %) and glucose (3 %), which was not previously used for production of organic acid.

Topinambur – inulin – mouldfungi – 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, 3]. К органическим кислотам относятся преимущественно карбоновые кислоты, молекулы которых содержат одну или несколько карбоксильных групп СООН. В зависимости от наличия карбоксильных групп различают одноосновные (уксусная) двухосновные (щавелевая, яблочная, янтарная, фумаровая) и трехосновные (лимонная, изолимонная) карбоновые кислоты.

Взаимопревращения органических кислот – одно из важнейших звеньев метаболизма и регулятор процессов обмена веществ в клетках живых организмов. Грибы и растения обладают уникальной способностью накапливать и выделять ди-

и трикарбоновые кислоты. У растений органические кислоты накапливаются в основном в вакуолях, а грибы, как правило, выделяют их во внешнюю среду. Хотя растения также обладают способностью выделять кислоты, интенсивность этого процесса не сопоставимо выше у грибов.

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 [9].

Как правило, грибы растут на богатых углеводами субстратах: фруктоза, глюкоза, сахароза крахмал, целлюлоза. Путём сбраживания углеводов при анаэробном брожении получают этиловый спирт, молочную, масляную, пропионовую и другие кислоты, при аэробном брожении – глюконовую, лимонную, фумаровую, щавелевую и другие кислоты.

В настоящее время в производстве органических кислот в основном применяются плесневые грибы рода *Asperegillus*, которые получают из культуральной жидкости при культивировании микроскопических грибов рода *Aspergillus* с последующим отделением биомассы. [9, 5].

Целью нашей работы было идентефикация и выделение органических кислот из культуральной жидкости *Aspergillus niger* при росте на экстракте, полученном из клубней топинамбура.

Топинамбур (*Helianthus tuberosus)* – это травянистое растение, которое не требует особого ухода. Это неприхотливое, засухоустойчивое, морозостойкое и урожайное растение. Внешне напоминает подсолнечник, но отличается от него тем, что в почве формирует клубни. Клубни топинамбура содержат около 15-20 % инулина. Инулин – высокомолекулярный углевод, полисахарид 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 инулин 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 органических кислот 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 12000,* полученный из коллекции культур микроорганизмов Центра депонирования микробов НПЦ Армбиотехнология НАН РА. Посевной материал представляет собой производственный штамм *A. niger*, обладающий высокой продуктивностью и всхожестью и не содержащий посторонней микрофлоры, который получают размножением конидий в пробирках на сусло-агаровых средах в стерильных условиях.

Для лабораторных испытаний посевной материал выращивали в пробирках на агаризованной синтетической среде Чапека следующего состава (г/л): $NaNO_3$ -2.0, KH_2PO_4-1.0, $MgSO_4.7H_2O$- 0.5, $FeSO_4.7H_2O$- 0.01, KCl -0.5, сахароза-20.0. Стерильную среду засевают конидиями культуры гриба и выдерживают в термостате при 32°С в течение 14 суток.

Для получения органических кислот штамм культивировали на экстракте, полученном из клубней топинамбура [4].

Подготовка питательной среды получением инулинсодержащего экстракта из клубней топинамбура.

Клубни топинамбура измельчали на гомогенизаторе и затем экстрагировали водой при 70°С (1:2 по объему) в течение 1 часа, время от времени перемешивая.

Измельченную массу клубней удаляли фильтрованием через мезгу под вакуумом. Далее фильтрат центрифугировали при 8000 g и надосадочную жидкость с инулином отделяли от фугата. Фильтрат, обработанный активированным углем, оказывался прозрачным и проницаемым [7].

Измеряли значение pH питательной среды pH-метром. Для этого промывали электроды дистиллированной водой, просушивали фильтровальной бумагой и опускали в стаканчик с питательной средой. Значение pH в экстракте доходило до 6.78. Стерилизацию экстаркта проводили в автоклаве при 0.5 атм.

Таблица 1. Условия получения экстракта клубней земляной груши

Степень измельчения клубней (мм)	Соотношение сырья и экстрагента	Продолжительность нагревания (мин)	Температура нагревания (^{0}C)	pH среды (ед)	Центрифугирование экстракта (об/мин)
1.5-2.0	1:2	60	80-85	6.8	8000/10

Культивирование плесневого гриба *Aspergilus niger* на экстракте осуществляли глубинным периодическим способом [4] на шейкере марки ES-357 со скоростью 100– 200 об/мин при температуре 30-32^{0}C. Стерилизацию эстракта проводили при 0.5 атм. Стерильный экстракт, содержащий около 6-8% инулина, засевают мицелием гриба. Подращивание осуществляют в 200 мл колбах на качалке при температуре 35^{0}C в течение нескольких суток. Посев микроорганизмов осуществлялся бактериологической петлей.

Определение кислотности индикатором метиловым красным (метилрот).

Метиловый красный (метилрот) – синтетический анилиноваый краситель, кислотно-основной индикатор. Не токсичен, не канцерогенен. Порошок тёмнокрасного цвета. В кислой среде метиловый красный приобретает красный цвет, в нейтральной и щелочной желтый (переход от красного к желтому приблизительно в интервале pH 4,4-6,2). Для приготовления 0,1 %-ного спиртового раствора 0,1 г метилового красного растворяют в 60 мл 96 %-ного спирта, а после растворения добавляют 40 мл дистиллированной воды [3].

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)

Содержание органических кислот в экстракте и в культуральных жидкостях *Aspergillus niger 12000* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе "Water Separations Modul 2695"США.

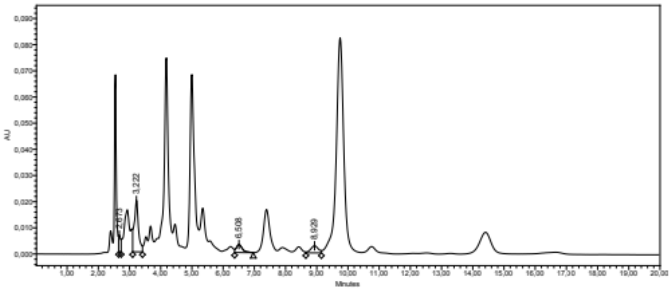
Результаты и обсуждение. В результате был проведен анализ содержания органиеских кислот в стерильном экстракте и получены данные. До начала культивирования pH экстракта был равен 6.7-6.8.

После культивирования *Aspergilus niger*, уже на 2-3 сутки наблюдается подкисление среды: при добавлении индикатора метилово-красного, среда приобретала красный оттенок. Значение pH понижается до 2.38-2.40. Пробы были взяты на вторые, четвертые, шестые и восьмые сутки. Был также проведен анализ органических кислот культуральных жидкостей *Aspergillus niger*.

В результате данных, полученных на ВЭЖХ, в ферментативном растворе была обнаружена смесь органических кислот – щавелевой, лимонной, яблочной и фумаровой. Анализ культуральных жидкостей, проведённый в различные сутки роста штамма *Aspergillus Niger 12000,* позволил выявить ряд особенностей выделения органических кислот микромицетами в зависимости от возраста культуры и условий культивирования.

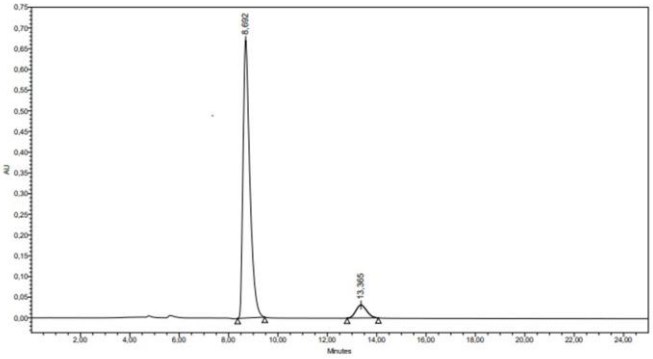
В результате данных анализа, проведенных на пробах культуры при глубинном периодическом культивировании на шейкере, при температуре 30-32^{0}C уже на вторые сутки роста наблюдается появление значительного количества лимонной кислоты – до 1.7-1.8 % (рис. 2).

Sample __1__
Chromatogram



	Name	Retention Time	Area	Height	Conc. mg/ml
1	Аспаргиновая кислота	2,673	28231	6388	0,24595
2	Винная кислота	3,222	185264	19647	0,398344
3	Лимонная кислота	6,508	41396	3058	0,191569
4	Фумаровая кислота	8,929	45281	2706	0,001854

Рис.1. Содержание органических кислот в экстракте



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Conc. mg/mL
1		8,692	12828610	93,03	672875	
2	Лимонная кислота	13,365	960595	6,97	31510	17,59

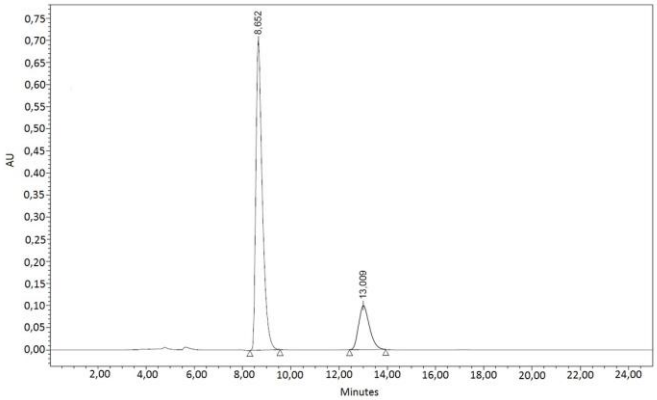
Рис.2. Содержание органических кислот в культуральной жидкости *Aspergillus niger12000* при глубинном периодическом росте.

Данные анализа, проведенных на пробах при периодической культивации (рис. 3) на шейкере, показали, что самое максимальное количество лимонной кислоты в культуральной жидкости *Aspergilus niger* наблюдается уже на четвертые сутки роста – до 5-6 % [8, 10], выход которого составляет 4-5 % от исходного вещества.

При более длительном культивировании – на второй неделе роста, наблюдается уменьшение количества лимонной кислоты. Появляется незначительное количество щавелевой и фумаровой кислот (рис. 4). Хотя значение лимонной кислоты уменьшается, оно продолжает находиться на максимуме инулина.

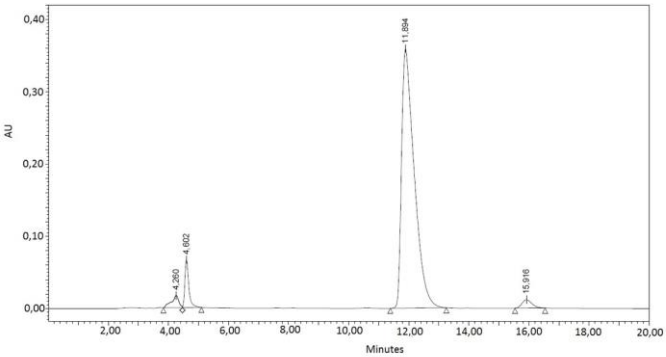
Было установлено, что в результате роста и метаболизма плесневого гриба образование лимонной кислоты происходит на 2-6 сутки после культивирования плесневого гриба на качалке при температуре роста 32^0С, в результате происходит значительное накопление лимонной кислоты – почти до конца второй недели.

Наилучшим условием образования лимонной кислоты является рост на качалке: т.е. достаточная аэрация и доступ молекулярного кислорода, усиленное встряхивание или перемешивание культуры [1,5].



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Conc. mg/mL
1		8,652	13089576	80,91	700043	
2	Лимонная кислота	13,009	3088534	19,09	99803	56,553

Рис. 3. Содержание органических кислот в культуральной жидкости *Aspergillus niger1 2000* при глубинном периодическом росте на четвертые сутки роста.



	Name	Retention Time	Area	% Area	Height	Amount(mg/ml)
1		4,260	285953	2,45	16902	
2	Щавелевая кислота	4,602	598417	5,13	66333	0.168
3	Лимонная кислота	11,894	10508543	90,12	359356	22.794
4	Фумаровая кислота	15,916	267529	2,29	11623	0.0063

Рис. 4. Содержание органических кислот в культуральной жидкости *Aspergillus niger 12000* при глубинном периодическом росте на шестые сутки роста.

Уже на второй недели роста наблюдается уменьшение количества лимонной кислоты и накопление щавелевой, фумаровой и яблочной кислот. Показано,что в результате роста плесневого гриба штамма *Aspergillus niger 12000* происходит последовательность образования органических кислот, замкнутых в цикле Кребса.

Обобщая полученные результаты, можно сказать о возможности биоконверсии инулина и простых сахаров, содержащихся в экстракте клубней топинамбура в органические кислоты в процессе глубинной ферментации штамма *A.niger*. Необходимо отметить, что производство органических кислот из экстракта топинамбу-

ра является более рентабельным. Оставшаяся после экстракции масса клубней и надземной растительной части может служить ценным кормом в животноводстве и сырьем для биогаза.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. *Концевая И.И.* Микробиология: культивирование и рост бактерий.. Издательство “Десна Полиграф”, Чернигов, с.13, 2017.
2. *Нетрусов А.И., И.Б. Котова,* Микробиология, изд. Академия, М., с. 116-120, 2006.
3. *Нечаев А.П., Траубенберг С.Е.,Кочеткова А.А.* Пищевая химия. Санкт-Петербург. ГИОРД. 6-е изд., с.292-304, 2015.
4. *Перт С.Дж*. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М., Мир, 331 с., 1978.
5. *Справочник химика 21,* Химия и химическая технология, с .486, ???
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 инулинсодержащего 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 20.07.2021